

---

*Bases moleculares que gobiernan la  
movilidad swarming de *Sinorhizobium meliloti*:  
conexión con formación  
de biopelículas y establecimiento de simbiosis.*

---

*Tesis Doctoral  
Lydia M<sup>a</sup> Bernabéu Roda  
2014*



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



**Departamento de Microbiología y Sistemas Simbióticos**

**Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada**



**Bases moleculares que gobiernan la  
movilidad *swarming* de *Sinorhizobium  
meliloti*: conexión con formación de  
biopelículas y establecimiento de simbiosis.**

Lydia M<sup>a</sup> Bernabéu Roda

Postgrado oficial en Biología Fundamental y de Sistemas

Tesis Doctoral 2014



Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Lydia M<sup>a</sup> Bernabéu Roda  
D.L.: GR 2139-2014  
ISBN: 978-84-9083-158-8



**Bases moleculares que gobiernan la movilidad  
*swarming* de *Sinorhizobium meliloti*: conexión  
con formación de biopelículas y establecimiento  
de simbiosis.**

Memoria que presenta la licenciada en Biología,  
Lydia M<sup>a</sup> Bernabéu Roda, para optar al título de Doctor

Fdo. **Lydia M<sup>a</sup> Bernabéu Roda**

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>

De la Directora de Tesis

Fdo. **María José Soto Misffut**

Doctora en Ciencias Biológicas

Científico Titular del CSIC

Granada, 2014



**María José Soto Misffut**, Científico Titular de la Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),

**Informa:**

Que el trabajo de investigación titulado “Bases moleculares que gobiernan la movilidad *swarming* de *Sinorhizobium meliloti*: conexión con formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis”, realizado por la licenciada Lydia M<sup>a</sup> Bernabéu Roda bajo mi dirección, se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral de la Universidad en Granada.

Granada, Abril 2014

Fdo. Dra. María José Soto Misffut





Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo de Genética de Infecciones Fitobacterianas perteneciente al Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín, gracias a una beca Predoctoral de formación de personal investigador, adscrita al Proyecto de Investigación de Excelencia CVI-3541, concedida por la Consejería de Innovación Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía.

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes congresos y publicaciones, o están en preparación:

**Congresos:**

Bernabéu-Roda, L., Amaya-Gómez, CV., Nogales, J., Cuéllar, V., Olivares, J., Soto, M.J. 2012. Genetic characterization of surface motility in *Sinorhizobium meliloti*. *10th European Nitrogen Fixation Conference*. Munich, Alemania.

Bernabéu-Roda, L., Amaya-Gómez, CV., Nogales, J., Cuéllar, V., Olivares, J., Soto, M.J. 2011. Identificación de genes que participan en el control del *swarming* de *Sinorhizobium meliloti*: papel en formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis. *IV Reunión del Grupo especializado SEM "Microbiología de Plantas"*. MIP11. Tánger, Marruecos.

**Publicaciones:**

Nogales, J., Bernabéu-Roda, L., Cuéllar, V., Soto, M. J. 2012. ExpR is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* 194(8):2027-35.



La doctoranda D<sup>a</sup> Lydia María Bernabéu Roda y la directora de la tesis D<sup>a</sup> María José Soto Misffut, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, abril 2014

María José Soto Misffut

Director de tesis

Lydia María Bernabéu Roda

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:





*A mi Abuela*



## **AGRADECIMIENTOS**

Es difícil incluir en unos renglones a todas aquellas personas que han colaborado de una o en otra forma en la elaboración de esta Tesis, ni hay palabras de agradecimiento suficientes capaces de expresar mi gratitud.

Sin duda, la pieza clave para que todo este trabajo haya llegado a buen puerto ha sido M<sup>a</sup> José Soto. Le agradezco a mi directora el haber sido batuta diestra capaz de dirigir y encajar instrumentos aparentemente discordantes en una perfecta armonía. Pero no es sólo por esto por lo que quiero darle las gracias, ya que su labor ha ido más allá de la de un director de orquesta, también ha sido guía y apoyo tanto en el ámbito científico como en el personal. Gracias por ser un modelo a seguir.

A Virgi, Carol y Nieves, porque esta Tesis recoge parte de sus experimentos y resultados. Carol, gracias por haber comenzado esta aventura que empieza en el Capítulo I. Virgi, eres más que apoyo técnico, eres el alma del laboratorio y tu ayuda siempre llega en el momento adecuado. Nieves, llegarás muy lejos, porque eres tan buena persona como científica, y eso, amiga, siempre tiene recompensa.

Agradezco la inestimable ayuda de Quina, que siempre encuentra una solución y puede explicarte de mil maneras la misma cosa para que lo entiendas. A M<sup>a</sup> José Lorite le agradezco cada una de las veces que ha solventado mis dudas y he de decir que han sido muchas. A Dani le agradezco sus consejos y, sobre todo, apoyo informático. A Soco, siempre dispuesta a echar una mano.

A David, que siempre escucha y ayuda en todo lo que pueda, compañero donde los haya. Vivi y Lorena, sois las otras dos patas del banco, gracias amigas por escucharme, socorrerme y entenderme. A Pao, a sus consejos y sonrisa.

Quiero agradecer a la Junta de Andalucía y al CSIC por financiarme en esta experiencia investigadora y, sobre todo, al personal de la EEZ, por el cariño mostrado a lo largo de estos años, me he sentido como en casa.

En lo personal, quiero agradecer a mis padres el haberme enseñado el afán de lucha que siempre me hace continuar, el haber volcado todos sus esfuerzos en brindarnos un futuro y, sobre todo, su apoyo y cariño. Aunque no hay una palabra capaz de reflejar la gratitud que un hijo siente hacia sus padres, os digo GRACIAS.

A mi abuela, aunque ausente, siempre presente y tremendamente añorada.

A los amores de mi vida indiscutibles. Javi, tu amor incondicional me anima, reconforta y fortalece día a día. Gracias por ayudarme a levantarme cada vez que he caído y, sobre todo, por tus abrazos que detienen el tiempo. A mi hijo Javier le doy las gracias por enseñarme qué es lo verdadero e importante de esta vida, tenerte es un regalo y un privilegio.

GRACIAS a todos por formar parte de mi camino, y, aunque aquí cierro una etapa de mi vida, advierto que: mi meta hoy, será mi línea de salida mañana.

Finalmente, a todo aquel que lea esta Tesis, le deseo una aventura tan placentera como ha sido para mí llevarla a cabo y, puesto que aquí dejo un poquito de mí, me gustaría haber dejado presente el rigor y el entusiasmo que he puesto en cada uno de los experimentos realizados.

## SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

aa	Aminoácido	NADP <sup>+</sup> /H	Nicotidamina adenín dinucleótido fosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico	ng	Nanogramo
AHLs	Acil homoserina lactonas	nM	Nanómetro
AN	Agar noble	ONPG	o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
Ap	Ampicilina	ORF	Marco abierto de lectura
ARN	Ácido ribonucleico	p/v	Peso/volumen
ATP	Adenosín trifosfato	pb	Pares de bases
Bm	Medio Bromfield	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Bv	Biovariedad	PVC	Cloruro de polivinilo
cDNA	DNA complementario	pSym	Plásmido simbiótico
CFUs	Unidades formadoras de colonias	QS	Quórum sensing
cm	Centímetros	Rhb1021	Rizobactina 1021
CV	Cristal violeta	rpm	Revoluciones por minuto
di-GMPc	Diguanilato cíclico	seg	Segundos
DMSO	Dimetilsulfóxido	SDS	Dodecil sulfato sódico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato	Sm	Sulfato de estreptomicina
D.O./DO	Densidad óptica	SOD	Superóxido dismutasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	sp	Especie
EPSs	Exopolisacáridos	Spc	Sulfato de espectinomicina
<i>et. al.</i>	Y colaboradores	TBE	Tampón tris-borato-EDTA
FBN	Fijación biológica de nitrógeno	Tc	Tetraciclina
FN	Factores de nodulación	2-TDC	2-tridecanona
fig.	Figura	TEM	Microscopio electrónico de transmisión
g	Gramos	Tn5	Transposón Tn5
h	Horas	Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
Kb	Kilobase	T3SS	Sistemas de secreción tipo III
Km	Kanamicina	TY	Medio de triptina y extracto de levadura
l	Litros	V	Voltios
LPS	Lipopolisacáridos	wt	Silvestre
M	Molar	X-gal	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-galactósido
Mb	Mega base	X-gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-glucorónido
mg	Miligramos	°C	Grados centígrados
ml	Mililitros	μg	Microgramos
mm	Milímetros	μl	Microlitros
MM	Medio mínimo	μm	Micrómeros
mM	Milimolar	μM	Micromolar
mRNA	RNA mensajero		
N <sub>2</sub>	Nitrógeno molecular		





## RESUMEN

Los rizobios son bacterias del suelo capaces de establecer simbiosis mutualista fijadoras de nitrógeno con plantas leguminosas. Existe un gran conocimiento sobre los genes bacterianos responsables de los rasgos más característicos de esta interacción: nodulación y fijación de N. Sin embargo, el conocimiento existente sobre las primeras etapas de la interacción como la adsorción y colonización de la superficie de la raíz, en los que la movilidad bacteriana y la capacidad de formar biopelículas pueden desempeñar un papel importante, es escaso. Se sabe que los procesos de quimiotaxis y movilidad, aunque no son esenciales para la nodulación o la fijación de nitrógeno, pueden facilitar el establecimiento de la simbiosis al dirigir a los rizobios hacia los sitios más adecuados para la infección de la planta hospedadora, influyendo así en la eficiencia y capacidad competitiva por la formación de nódulos. Pese a ello, son pocas las investigaciones que se han centrado en identificar señales medioambientales y reguladores que controlan la capacidad de movimiento de los rizobios, identificar y caracterizar distintos modos de translocación en superficie de estas bacterias así como determinar el papel que pueden tener cada uno de ellos en las diferentes etapas de la interacción con la planta.

*Sinorhizobium meliloti*, el endosimbionte de alfalfa, constituye un modelo dentro de la clase de las alfa proteobacterias para el estudio de distintos aspectos de la movilidad bacteriana que difieren notablemente del paradigma de enterobacterias. Fue precisamente en esta bacteria, durante las investigaciones llevadas a cabo por el grupo en el que se ha desarrollado este trabajo, donde por primera vez se identificó la movilidad *swarming* asociada a un rizobio (Soto et al. 2002). El *swarming* es un tipo de translocación bacteriana en superficie, dependiente de acción flagelar y caracterizado por ser un movimiento rápido y coordinado que conlleva un proceso de diferenciación celular. En bacterias patógenas de animales, este tipo de translocación que muestra gran conexión con la capacidad de formar biopelículas, favorece la virulencia. En *S. meliloti*, el *swarming* se identificó por primera vez asociado a un mutante en el gen *fadD* que codifica una acil-CoA ligasa específica de ácidos grasos de cadena larga. Esta mutación, además de alterar la expresión de genes simbióticos y de movilidad, provoca defectos en la capacidad de nodular plantas de alfalfa (Soto et al. 2002). Este hecho unido a resultados

obtenidos en otros rizobios, sugiere que componentes esenciales para el *swarming* y/o factores que se co-regulan con este proceso, pueden ser importantes en la interacción con la planta. Investigaciones enfocadas a la caracterización del *swarming* en *S. meliloti* han revelado entre otros resultados que i) el control del desplazamiento en superficie puede ser distinto entre distintas cepas de *S. meliloti*, ii) la importancia del sideróforo rizobactina 1021 (Rhb1021) en la translocación en superficie de la cepa Rm1021 (Nogales *et al.*, 2010; Nogales *et al.*, 2012), o iii) la conexión existente entre movilidad *swarming*, formación de biopelículas y capacidad colonizadora de raíces de alfalfa (C.V. Amaya-Gómez 2013). Con estos antecedentes, el **objetivo** de este trabajo ha sido profundizar en las bases moleculares, determinantes genéticos y señales, que gobiernan la movilidad en superficie de la bacteria modelo *S. meliloti*, investigando además su posible conexión con formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis con alfalfa.

Con el fin de identificar determinantes genéticos que pudieran estar implicados en la movilidad en superficie de *S. meliloti*, al inicio de este trabajo se llevó a cabo una aproximación genética basada en la caracterización de transposantes derivados de mutantes *fadD* de *S. meliloti* (1021*fadD* y GR4*fadD*) que estuvieran alterados en desplazamiento en superficie. Se han caracterizado un total de 14 transposantes (7 derivados de 1021*fadD* y 7 derivados de GR4*fadD*). Llamó la atención desde un principio que ninguno de los transposantes derivados de 1021*fadD* mostrasen una motilidad nula en superficie, mientras que en el caso de GR4*fadD*, hasta 5 transposantes presentaron este fenotipo. Este hecho apuntaba a la existencia de distintos mecanismos implicados en el movimiento en superficie de estas bacterias, hipótesis que ha sido corroborada en estudios posteriores. La caracterización genética de los distintos transposantes ha puesto de manifiesto la participación de genes relacionados con movilidad tales como genes esenciales en la síntesis, ensamblaje y funcionamiento del flagelo (*visN*, *visR*, *flhA*, *flgG*, *flgI*, *flgH*, *motC*), y genes de quimiotaxis (*cheA*). Pero también se han identificado genes que aparentemente no están relacionados con movilidad bacteriana como genes de respuesta a estreses ambientales (*sodB*), reguladores que afectan la producción de exopolisacáridos (*exoX* y *emma*), además de un gen de función hasta ahora desconocida (*smc00525*). De los 14 genes identificados, sólo dos (*exoX* y *smc00525*) afectan específicamente la

translocación en superficie de mutantes *fadD* de *S. meliloti*, lo que motivó un estudio más detallado abordado en el capítulo 2. Aunque todos los transposantes aislados en este estudio dieron lugar a la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, algunos presentaron distinta capacidad infectiva y competitiva. Así, NS26(1021FDCSS*flgG*::Tn5), SPS324 (1021FDCSS*cheA*::Tn5), GNS5(1021FDCSS*flgK*::Tn5), y GSPS51(GR4FDCSS*smc00525*::Tn5), mostraron menor capacidad infectiva que la cepa parental, mientras que los transposantes NS33(1021FDCSS*sodB*::Tn5), GNS43(GR4FDCSS*flgC*::Tn5), GNS76(GR4FDCSS*visN*::Tn5) y GNS61(GR4FDCSS*emmaA*::Tn5), resultaron estar afectados en competitividad.

La caracterización genética y fenotípica de los transposantes derivados de fondos *fadD* de *S. meliloti* alterados en movilidad en superficie, centró nuestra atención en tres genes: *cheA*, *exoX* y *smc00525*. Las razones de nuestro interés se basaban en que por un lado, el gen *cheA* se había identificado asociado a un transposante que mostraba mayor translocación en superficie que la cepa silvestre, efecto contrario al que se había descrito en la bibliografía que genera la pérdida de función de la autoquinasa de quimiotaxis en enterobacterias. Además el transposante afectado en *cheA* mostraba un defecto en infectividad. Por otro lado, los genes *exoX* y *smc00525* fueron los únicos genes identificados que afectaban específicamente la translocación en superficie de mutantes *fadD* de *S. meliloti*, sin tener efecto en movilidad *swimming*. Para asegurar que los fenotipos observados eran debidos exclusivamente a la alteración del gen que había sido interrumpido por el Tn5, y no el resultado de efectos polares o mutaciones secundarias, como primer paso a un estudio más detallado de los genes de interés, se procedió a la obtención de mutantes por delección en fase, tanto en el fondo genético de donde procedía el transposante (para corroborar fenotipo) como en otras 3 cepas de *S. meliloti* (las cepas silvestres GR4 y Rm1021 y otro fondo *fadD* distinto). Se ha realizado la caracterización fenotípica de un total de 12 mutantes intentando descifrar el papel de cada gen en movilidad en superficie, así como en formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis con alfalfa. Se ha comprobado que la histidín quinasa CheA del sistema de quimiotaxis afecta la movilidad *swimming* de *S. meliloti*, pero a diferencia de enterobacterias, no es esencial en el movimiento en superficie, ni provoca ningún cambio significativo en este tipo de translocación por lo que se

abandonó la idea de continuar con su caracterización. En *S. meliloti*, ExoX afecta negativamente a la cantidad de succinoglucano (EPS I) producido mediante un mecanismo post-traduccional en el que la estequiometría con ExoY, una glicosiltransferasa requerida en la síntesis del polisacárido, es importante. Se ha descrito que mutaciones en este gen causan un incremento en la producción de EPS I (mayoritariamente la fracción de bajo peso molecular) mientras la presencia de *exoX* en multicopia reduce significativamente los niveles de succinoglucano. En este trabajo demostramos que independientemente del fondo genético de *S. meliloti*, la pérdida de función de *exoX* incrementa la cantidad de succinoglucano producido y la capacidad de formar biopelículas sobre superficies abióticas, estando ambos fenotipos relacionados. Por el contrario el efecto de *exoX* en translocación en superficie es distinto dependiendo de la cepa de *S. meliloti*: mientras en GR4 *exoX* no influye en motilidad, la superproducción de EPS I causada por la delección del gen *exoX* en Rm1021 incrementa la translocación en superficie promoviendo tanto movilidad independiente como dependiente de flagelos (Nogales *et al.*, 2012). La producción de niveles normales de EPS I sin embargo, no es esencial en el desplazamiento en superficie de Rm1021, como así lo demuestra el comportamiento de mutantes *exoY* defectivos en la síntesis del polisacárido. Por último, la caracterización de 4 mutantes delecionados en el gen *smc00525* que potencialmente codifica una proteína transmembrana de gran tamaño y muy conservada entre los rizobios, ha revelado que este gen participa en el control de la movilidad en superficie, la capacidad de formar biopelículas así como en la interacción planta-bacteria, en GR4 pero no en Rm1021, cepa en la que sólo se han visto ligeros efectos en movilidad en superficie. SMC00525 promueve la movilidad *swarming* de GR4 pero interfiere negativamente con el movimiento independiente de flagelos mostrado por GR4fadD. En ausencia de cuerpo basal y gancho (Hook Basal Body, HBB), *smc00525* contribuye al desplazamiento en superficie muy especialmente en un fondo *fadD*. El análisis de expresión génica global de un mutante GR4fadD $\Delta$ 525 en medio mínimo semisólido no aporta gran información sobre el modo de actuación de esta proteína, aunque es llamativa la menor expresión de genes relacionados con la adquisición y metabolismo del hierro. Interesantemente, SMC00525 contribuye a las características simbióticas de *S. meliloti* GR4 y GR4fadD afectando a los niveles de expresión de genes *nod* comunes y a la capacidad competitiva de la bacteria.



Como último objetivo de esta Tesis, se ha caracterizado la movilidad mostrada por las cepas GR4 y Rm1021 de *S. meliloti* en dos nuevas condiciones inductoras de movilidad en superficie: agar noble (AN) y 2-tridecanona (2-TDC). El empleo de AN fue resultado de la búsqueda de condiciones que permitieran poner de manifiesto movilidad en superficie en la cepa GR4 de *S. meliloti*, y que al mismo tiempo permitieran mayor reproducibilidad en los ensayos de translocación en superficie. Tras probar distintos agentes gelificantes a distintas concentraciones pudimos comprobar que la utilización de AN en concentraciones de 0.6-0.8% proporciona condiciones más permisivas y reproducibles para la observación y análisis detallado de movilidad en superficie en *S. meliloti* que otros tipos de agar como el purificado de la casa comercial Pronadisa, previamente utilizado en estos estudios. Hemos comprobado además que estas mismas condiciones pueden ser utilizadas para estudiar el comportamiento en superficie de otros rizobios como *R. etli*, *R. leguminosarum* o *S. fredii*. Bajo las nuevas condiciones de ensayo, hemos confirmado el papel del hierro en el control de la movilidad en superficie de *S. meliloti*. Condiciones de deficiencia de hierro reducen el desplazamiento en superficie mostrado por distintas cepas de *S. meliloti*, pero muy especialmente en el caso de 1021fadD, mientras que la presencia de altas concentraciones de hierro reducen en mayor o menor intensidad el desplazamiento en superficie de cepas silvestres, pero no en mutantes *fadD*.

El empleo de AN nos ha permitido llevar a cabo una caracterización en profundidad del tipo de movilidad en superficie mostrado por GR4 y Rm1021, así como por sus correspondientes mutantes *fadD*, revelándose notables diferencias en los mecanismos empleados. Así, la cepa GR4 se desplaza en superficie de MM semisólido utilizando *swarming* ya que es un movimiento absolutamente dependiente de acción flagelar. No obstante, el empleo de dos mutantes aflagelados afectados en distintas fases del ensamblaje del flagelo (*flaAB* y *flgK*), ha permitido poner de manifiesto que en ausencia de un HBB completo, GR4 es capaz de poner en marcha un desplazamiento sobre superficie independiente de acción flagelar cuyas bases moleculares no han sido investigadas en este estudio, pero en la que *smc00525* parece participar, como ya se ha comentado. A diferencia de GR4, la cepa Rm1021 que muestra mayor capacidad de dispersión en superficie, se desplaza utilizando mayoritariamente un movimiento independiente de flagelos en el que la

producción del sideróforo Rhb1021 desempeña un papel importante y que se ve abolido en ausencia de gancho flagelar. Los resultados obtenidos en este estudio también demuestran que el efecto que la mutación *fadD* ejerce sobre la movilidad en superficie de *S. meliloti* es altamente dependiente del fondo genético. La ausencia de FadD en GR4 incrementa el desplazamiento en superficie de esta bacteria pero no por un incremento de *swarming* sino por promover un movimiento independiente de flagelos cuya manifestación requiere la presencia de un HBB completo. A diferencia de lo observado para GR4, una mutación *fadD* no incrementa significativamente la movilidad en superficie de Rm1021 al interferir drásticamente con el movimiento mayoritario independiente de flagelos característico de Rm1021. Esta interferencia causada por la mutación *fadD* requiere la presencia de un HBB ensamblado.

Durante la búsqueda del metabolito de naturaleza lipídica responsable de los fenotipos asociados a los mutantes *fadD* de *S. meliloti*, se identificó la 2-TDC como una metilcetona que se acumulaba sólo en mutantes *fadD*, y que añadida de modo exógeno como compuesto volátil, inducía la movilidad de la cepa GR4. Utilizando las nuevas condiciones de ensayo, hemos demostrado que la metil undecil cetona promueve la movilidad en superficie de las cepas GR4 y Rm1021 de *S. meliloti* estimulando tanto el movimiento dependiente como el independiente de flagelos. Este efecto estimulador de la translocación en superficie apenas es apreciable en fondos *fadD*, pero sí en un mutante defectivo en la síntesis del sideróforo Rhb1021. El análisis transcriptómico de Rm1021 en respuesta a 2-TDC no ha permitido descifrar aún el mecanismo molecular por el que esta metilcetona promueve movilidad en superficie en *S. meliloti*. No obstante, se ha comprobado que el efecto causado por la 2-TDC en expresión génica de Rm1021 es distinto dependiendo de si las células crecen en medio líquido o sobre una superficie. Sólo en células crecidas sobre superficie semisólida, la aplicación de 2-TDC ha provocado alteraciones significativas en la expresión génica. Además de la ausencia de genes flagelares y de movilidad entre los genes diferencialmente expresados, y la inducción de genes relacionados con respuesta a distintos estreses, destaca la represión de genes previamente relacionados con la translocación en superficie de Rm1021 y que incluye los implicados en regulación, síntesis y transporte del sideróforo Rhb1021.

Como conclusión general, este trabajo ha puesto de manifiesto la enorme complejidad del movimiento en superficie de una bacteria que interacciona con plantas como es *S. meliloti*, y en la que se incluyen las grandes diferencias en los mecanismos de regulación mostradas por cepas de la misma especie. Se ha podido asignar una función a genes no caracterizados hasta el momento como *smc00525*, así como funciones adicionales a genes previamente descritos pero no relacionados con movilidad (*exoX*). Los resultados obtenidos han abierto nuevas líneas de investigación como el control coordinado de expresión génica con el estado de ensamblaje del flagelo totalmente desconocido en rizobios, la participación de un nuevo gen en el control de la expresión de los genes *nod*, o el mecanismo de acción de 2-TDC como molécula señalizadora entre bacterias. La identificación de *smc00525* como gen que afecta las propiedades simbióticas de *S. meliloti*, y de la 2-TDC como compuesto que altera el comportamiento en superficie de las bacterias y limita la infección bacteriana, corrobora la validez de la estrategia basada en la caracterización de las bases moleculares que gobiernan la movilidad en superficie de *S. meliloti*, para identificar genes y señales con funciones importantes en las interacciones planta-bacteria.



**INTRODUCCIÓN**

1. Movilidad bacteriana. Generalidades.....	3
2. Características del <i>swarming</i> .....	10
2.1 Desafíos del <i>swarming</i> . .....	14
2.2 El papel de los flagelos en <i>swarming</i> . .....	17
2.3 Señales extracelulares desencadenantes del <i>swarming</i> .....	20
2.3.1 Señales químicas extracelulares: Quorum sensing (QS) .....	20
2.3.2 Condiciones nutricionales.....	21
2.4 Relación entre <i>swarming</i> y virulencia.....	23
3. Movilidad y formación de biopelículas. ....	24
4. Simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa .....	28
5. Aspectos relevantes de la movilidad de <i>Sinorhizobium meliloti</i> . ....	33
6. <i>Swarming</i> en <i>Rhizobium</i> .....	38
7. Movilidad y quimiotaxis en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa .....	42
8. Formación de biopelículas en <i>Rhizobium</i> . ....	44
9. Papel de la movilidad y formación de biopelículas en la simbiosis <i>Rhizobium</i> - leguminosa. ....	48
<b>OBJETIVOS</b> .....	53

**MATERIALES Y MÉTODOS**

1. Técnicas microbiológicas.....	57
1.1 Cepas y plásmidos utilizados .....	57
1.2 Medios de cultivo. ....	61
1.3 Antibióticos.....	62
1.4 Conservación de cepas bacterianas.....	63
1.5 Conjugaciones biparentales .....	63
1.6 Transducción.....	63
1.7 Ensayos de movilidad <i>swarming</i> .....	64
1.8 Ensayos de movilidad <i>swimming</i> .....	65
1.9 Ensayos de formación de biopelículas .....	65

1.9.1 Formación de biopelículas en placas de PVC.....	65
1.9.2 Formación de biopelícula en tubo de vidrio .....	66
1.10 Curvas de crecimiento .....	67
2. Técnicas de biología molecular .....	67
2.1 Aislamiento de ADN plasmídico.....	67
2.1.1 Mini preparación mediante lisis alcalina .....	67
2.1.2 Mini preparación de ADN plasmídico con el kit Genelute plasmid (SIGMA) .....	69
2.2 Aislamiento de ADN genómico total.....	70
2.3 Aislamiento de ARN total de <i>S. meliloti</i> .....	70
2.4 Concentración de muestras de ARN total de <i>S. meliloti</i> .....	72
2.5 Estimación de la concentración de ADN y ARN .....	72
2.6 Manipulación del ADN .....	73
2.6.1 Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción.....	73
2.6.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa .....	73
2.6.3 Revelado de geles y fotografía.....	73
2.6.4 Estimación del tamaño molecular de los fragmentos de ADN .....	73
2.6.5 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa. ....	74
2.7 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	75
2.8 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	76
2.9 Experimentos de hibridación ADN-ADN .....	76
2.9.1 Transferencia de ADN a filtros de nylon .....	76
2.9.2 Marcaje de sondas de ADN no radioactivas .....	77
2.9.3 Hibridación ADN-ADN con sondas de ADN no radioactivas .....	78
2.10 Amplificación de ADN mediante PCR.....	79
2.11 Mutagénesis in vitro por delección mediante PCR solapante .....	80
2.12 Secuenciación automática de ADN de doble cadena.....	81
2.13 Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas.....	81
2.14 Experimentos de <i>microarrays</i> .....	82

2.14.1 Reversotranscripción del ARN .....	82
2.14.2 Hidrólisis de ARN .....	82
2.14.3 Marcaje del cDNA.....	83
2.14.4 Procesamiento del <i>microarray</i> previo a la hibridación.....	84
2.14.5 Hibridación de los <i>microarrays</i> .....	84
2.14.6 Procesamiento del <i>microarray</i> tras la hibridación .....	85
2.14.7 Adquisición de la imagen y tratamiento de los datos .....	85
2.15 RT- qPCR (Reverse transcription quantitative real-time PCR) .....	86
2.15.1 Síntesis de cDNA para RT-qPCR.....	86
2.15.2 Amplificación para la cuantificación de expresión .....	86
3. Ensayos con plantas .....	87
3.1 Esterilización y germinación de semillas de alfalfa .....	87
3.2 Solución nutritiva para el cultivo de plantas .....	87
3.3 Cultivo axénico de plantas .....	88
3.4 Medida del grado de infectividad .....	88
3.5 Medida del grado de competitividad .....	89
4. Técnicas analíticas.....	90
4.1 Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa en cultivos celulares ....	90
5. Técnicas microscópicas.....	91
<b>CAPÍTULO I:</b>	
<b>1. Identificación de determinantes genéticos implicados en la movilidad en superficie mostrada por mutantes <i>fadD</i> de <i>S. meliloti</i> GR4 y Rm1021.....</b>	<b>95</b>
1.1 Obtención y selección de mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados en movilidad mediante mutagénesis al azar.....	95
1.2 Caracterización genética de los mutantes alterados en movilidad. ....	96
1.3 Caracterización fenotípica de los mutantes alterados en movilidad. ...	100
1.3.1. Crecimiento .....	100
1.3.2. Movilidad .....	103

1.4 Visualización al microscopio electrónico de transmisión (TEM). .....	104
1.5 Fenotipo simbiótico.....	107
<b>CAPÍTULO I. DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
<b>CAPÍTULO I. ANEXOS</b>	
Anexo 1. Caracterización genética de los mutantes alterados en movilidad en superficie.....	127
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>2. Caracterización funcional de <i>cheA</i>, <i>exoX</i> y <i>smc00525</i> en distintos fondos genéticos de <i>S. meliloti</i>: Participación en movilidad en superficie, formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis con alfalfa.....</b>	<b>133</b>
2.1 Obtención de mutantes por delección en los genes <i>cheA</i> , <i>exoX</i> y <i>smc00525</i> , identificados previamente por su posible implicación en movilidad en superficie de <i>Sinorhizobium meliloti</i> , en las cepas GR4 y Rm1021 así como en sus correspondientes derivados <i>fadD</i> . .....	134
2.1.1 Caracterización fenotípica de mutantes de <i>S. meliloti</i> delecionados en el gen <i>cheA</i> ( <i>smc03007</i> ).....	134
2.1.1.1 Movilidad .....	135
2.1.2 Caracterización fenotípica de mutantes de <i>S. meliloti</i> delecionados en el gen <i>exoX</i> ( <i>smb20947</i> ).....	138
2.1.2.1 Movilidad .....	138
2.1.2.2 Crecimiento .....	139
2.1.2.3 Mucosidad y fluorescencia en placas con calcoflúor.....	141
2.1.2.4 Formación de biopelículas.....	142
2.1.2.5 Fenotipo simbiótico.....	144
2.1.2.6 Construcción y caracterización de dobles mutantes en los genes <i>exoX</i> ( <i>smb20947</i> ) y <i>exoY</i> ( <i>smb20946</i> ). .....	145
2.1.3 Caracterización fenotípica de mutantes de <i>S. meliloti</i> , - delecionados en el gen <i>smc00525</i> . .....	149
2.1.3.1 Movilidad .....	150
2.1.3.2 Visualización del microscopio electrónico (TEM).....	154
2.1.3.3 Crecimiento .....	156
2.1.3.4 Formación de biopelículas .....	156



2.1.3.5 Fenotipo simbiótico.....	158
2.1.3.6 Análisis transcriptómico del mutante GR4fadDΔ525 crecido en una superficie semisólida. ....	160
2.1.3.7 Influencia de la delección <i>smc00525</i> en los genes <i>nod</i> . ....	165
<b>CAPÍTULO II. DISCUSIÓN.....</b>	<b>169</b>
<b>CAPÍTULO II. ANEXOS .....</b>	<b>181</b>
Anexo 2.1 Construcción de mutantes en los genes <i>cheA</i> , <i>exoX</i> y <i>smc00525</i> en <i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm1021, GR4 y sus derivados <i>fadD</i> .....	181
Anexo 2.1.1 Construcción de mutantes en el gen <i>cheA</i> ( <i>smc03007</i> ) de <i>S.meliloti</i> Rm1021, GR4 y sus derivados <i>fadD</i> .....	182
Anexo 2.1.2 Construcción de mutantes en el gen <i>exoX</i> ( <i>smb20947</i> ) de <i>S. meliloti</i> Rm1021, GR4 y sus derivados <i>fadD</i> .....	182
Anexo 2.1.3 Construcción de mutantes en el gen <i>smc00525</i> de <i>S. meliloti</i> Rm1021, GR4 y sus derivados <i>fadD</i> .....	184
Anexo 2.2 Construcción de mutantes en el gen y <i>exoY</i> en 1021Δ <i>exoX</i> , GR4Δ <i>exoX</i> y sus derivados <i>fadD</i> . ....	186
Anexo 2.3. Construcción de mutantes <i>flaAB</i> y <i>flgK</i> . ....	188
Anexo 2.3.1. Construcción de mutantes <i>flaA flaB (flaAB)</i> . ....	188
Anexo 2.3.2. Construcción de mutantes <i>flgK</i> .....	189
Anexo 2.4. Análisis global transcripcional de células del mutante GR4fadDΔ525 crecidas en medio mínimo semisólido. ....	191
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>3. Caracterización de la movilidad mostrada por las cepas GR4 y Rm1021 de <i>S. meliloti</i> en dos nuevas condiciones inductoras de movilidad en superficie: agar noble y 2-tridecanona (2-TDC), e identificación de posibles mecanismos implicados. ....</b>	<b>207</b>
3.1 Agar noble como inductor de movilidad en superficie.....	207
3.1.1 Movilidad de GR4 y GR4fadD en MM 0.6% agar noble. ....	209
3.1.2 Movilidad de Rm1021 y 1021fadD en MM 0.6% agar noble.....	213
3.1.3 Movilidad en superficie de otros rizobios MM 0.6% agar noble. ....	217
3.1.4 Efecto de la densidad de inóculo de <i>S. meliloti</i> en la aparición de movimiento en superficie en las nuevas condiciones de ensayo.....	218

3.1.5 Influencia de la concentración de hierro en la movilidad en superficie mostrada por distintas cepas de <i>S. meliloti</i> en MM 0.6%.AN.....	220
3.2 Estudio del efecto de la 2-tridecanona (2-TDC) en <i>S. meliloti</i> . .....	224
3.2. 1 Efecto de la 2-TDC sobre la movilidad de <i>S. meliloti</i> . .....	226
3.2.2 Análisis transcriptómico de Rm1021 con 2-TDC. ....	237
<b>CAPÍTULO III. DISCUSIÓN</b> .....	245
<b>CAPÍTULO III. ANEXOS</b> .....	257
A3.1 Construcción del mutante 1021fadDrhbD. ....	257
A3.2 Análisis transcriptómico. ....	257
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	263
<b>CONCLUSIONES</b> .....	279
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	285

# **INTRODUCCIÓN**



## 1. Movilidad bacteriana. Generalidades.

La supervivencia es la finalidad de todo organismo vivo y las bacterias no son una excepción a esta máxima. Para garantizar dicha supervivencia las células bacterianas son capaces de orientar y dirigir su movimiento en respuesta a diversos factores detectados en el medio como pueden ser gradientes de luz y oxígeno. De igual modo son capaces de responder a gradientes químicos, orientando su movimiento en función de la presencia o no de determinados compuestos presentes en el medio que les rodea (fenómeno conocido como quimiotaxis). Todo esto les permite incrementar la eficiencia en la adquisición de nutrientes, dispersarse por el medio ambiente, huir de sustancias tóxicas, o alcanzar y colonizar al hospedador estableciendo asociaciones mutualistas o patogénicas con plantas y animales. Por todo esto no es de extrañar que la movilidad bacteriana haya sido objeto de estudio a lo largo de los años, sin embargo, aún quedan muchas incógnitas por despejar.

Se han descrito distintos tipos de movilidad bacteriana basados en el motor que origina el movimiento y el medio en el que tienen lugar (Henrichsen, 1972; Kearns, 2010)(fig.1). En función del medio en el que tienen lugar encontramos los siguientes tipos de movilidad bacteriana:

### A) Movimiento en medios líquidos:

*SWIMMING*: se trata de un movimiento dependiente de flagelos que tiene lugar cuando la bacteria se encuentra en medios líquidos o en medios con una densa capa de fluido y se caracteriza por un patrón de movimiento bacteriano desorganizado.

### B) Movimientos en superficie:

*SLIDING*: consiste en un desplazamiento pasivo sobre una superficie. Se produce como consecuencia de la fuerza expansiva que sufren las bacterias hacia la periferia de la colonia al crecer, siendo facilitado por la acción de un surfactante que disminuye la tensión superficial del medio (fig.1a).

*TWITCHING*: es un movimiento de células bacterianas individuales en superficie causado por la extensión y retracción de pili tipo IV (fig. 1b).

*GLIDING*: es un movimiento bacteriano en superficie muy estudiado en mixobacterias, que no requiere la actuación de flagelos o de pili y que implica

la acción de complejos focales de adhesión. Estos componentes anclan la bacteria al substrato y posiblemente actúan como motor (fig.1c).

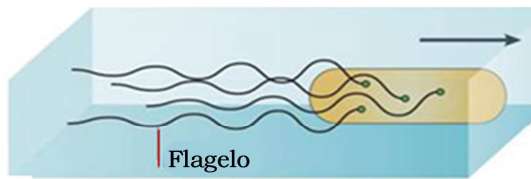
*SWARMING*: Este tipo de translocación bacteriana en superficie se caracteriza por el movimiento rápido y coordinado de toda una población sobre una superficie semisólida (Daniels *et al.*, 2004; Harshey, 2003). Al igual que el *swimming*, se trata de un movimiento dependiente de flagelos. Sin embargo, a diferencia del *swimming* que es un movimiento de células individuales en un medio líquido, en el *swarming* las células se mueven en grupos conocidos como *rafts*. Este tipo de translocación tiene la característica especial de conllevar un proceso de diferenciación celular en mayor o menor medida, en el que las bacterias sufren generalmente un proceso de elongación e hiperflagelación (fig.1d).

Los pili tipo IV y los flagelos son los principales órganos de locomoción bacteriana.

El flagelo es una de las estructuras procarióticas más complejas. Los flagelos son apéndices filamentosos extracelulares largos y finos (10-15 micras de longitud y de 20 nm de diámetro), helicoidales y responsables del desplazamiento en respuesta a diferentes estímulos del medio (quimiotaxis, aerotaxis...), de la colonización de plantas o animales, de la formación de biofilm o de la dispersión celular. El número de flagelos por célula y su distribución a lo largo de la superficie de ésta difiere en cada una de las especies bacterianas.

Pese a las diferencias que puedan existir, el flagelo está compuesto desde la base a la zona superior por tres partes. Lo primero que nos encontramos es una estructura compleja denominada cuerpo basal que se encuentra embebida dentro de las envueltas bacterianas (membrana citoplasmática y pared celular), está compuesto por un eje central que atraviesa 1 ó 2 anillos y otras subestructuras. El cuerpo basal posee varias funciones, una de ellas es la de anclar el flagelo a la célula, por otro lado es el principal responsable del mecanismo del movimiento (consistente en un motor rotatorio capaz de girar en un sentido o en otro) y por último, alberga el aparato para la secreción y correcto ensamblaje de la mayor parte del flagelo.

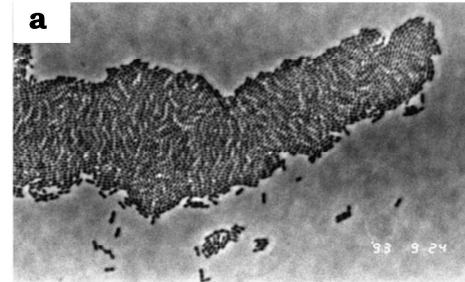
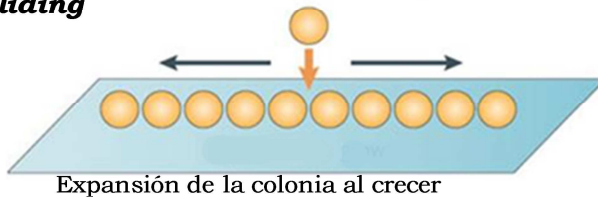
**Movilidad bacteriana en medios líquidos**



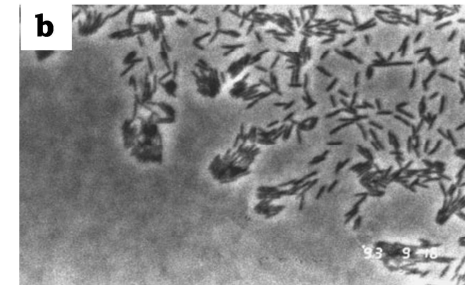
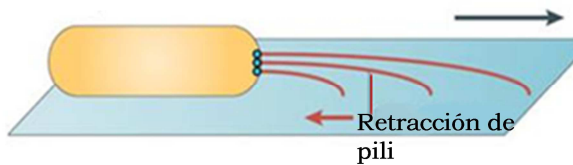
**Swimming**

**Tipos de movilidad bacteriana en superficie**

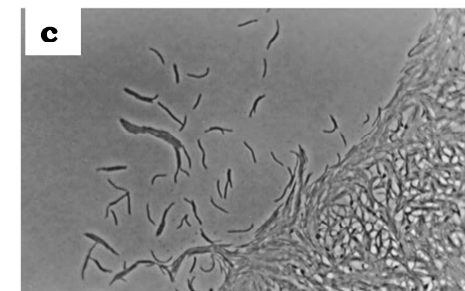
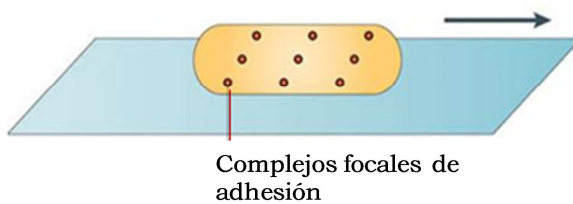
**Sliding**



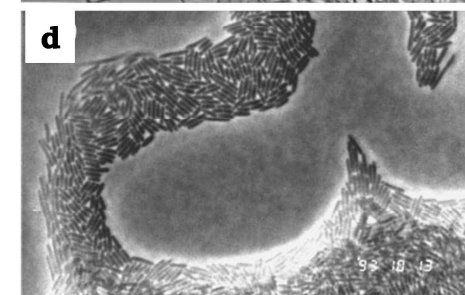
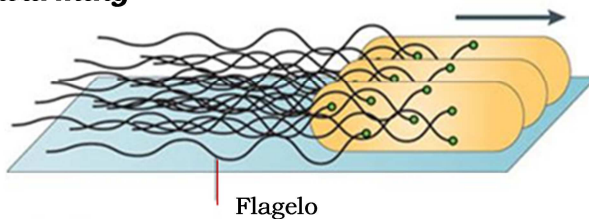
**Twitching**



**Gliding**



**Swarming**



**Figura 1.** A la izquierda de la figura aparecen los modelos descriptivos de los distintos tipos de movilidad bacteriana. Las flechas negras indican el sentido del movimiento y el motor que origina el movimiento aparece de color rojo. A la derecha se muestran imágenes de los bordes de avance de las colonias que presentan movilidad bacteriana en superficie tipo *sliding* en *Serratia marcescens* (a), *twitching* observado en *Pseudomonas aeruginosa* (b), *gliding* de *Cytophaga hutch* (c) y *swarming* en *Proteus mirabilis* (d). Adaptado de Kearns (2010) y tomado de Harsey (2003), respectivamente.

En segundo lugar encontramos el codo o gancho que consiste en un cilindro curvado y flexible capaz de convertir el movimiento de rotación en ondas. En

la zona superior aparece el filamento que consiste en un tubo hueco de estructura helicoidal formado por la polimerización de unas 20000 subunidades de una proteína mayoritaria denominada flagelina (Smith and Hoover, 2009).

1. En el cuerpo basal de bacterias Gram-negativas se distinguen cuatro anillos. Encontramos un anillo L (FlgH) asociado a la membrana externa (lipopolisacáridos), otro anillo P (FlgI), que se asocia con la pared celular (capa de peptidoglucano), un tercero denominado anillo MS (FliF), que se encuentra inserto en la membrana plasmática y, por último, el anillo C, asociado también a la membrana pero por el lado citoplasmático. Fuertemente unido al anillo MS aparece el eje del rotor (FliE, FlgB, FlgC, FlgF, FlgG) que se extiende hasta el gancho y que actúa como eje de transmisión. El motor está compuesto por el rotor y el estátor. El rotor lo conforman el anillo C junto con tres proteínas implicadas en el cambio de sentido de giro del motor, a favor o en contra de las agujas del reloj, denominadas FliG, FliM y FliN. El estátor rodea al rotor y está formado por múltiples copias de MotA y MotB. Finalmente, sito dentro del canal central del anillo MS, se encuentra el sistema de secreción tipo III, que transporta la mayoría de las proteínas flagelares localizadas en el exterior celular. La energía necesaria para la secreción no proviene de la hidrólisis de ATP sino de la fuerza protón-motriz generada por la entrada de protones a través de un espacio entre los anillos MS y C (Chevance and Hughes, 2008; Minamino, 2013; Smith and Hoover, 2009; Terashima, 2008)
2. El codo, articulación o gancho es una estructura curvada y flexible entre el filamento y el cuerpo basal que consta de 130 unidades de la proteína FlgE. Esta estructura actúa como una bisagra flexible capaz de transmitir la fuerza de torsión generada en el motor hasta el filamento (Terashima, 2008).
3. El filamento es una estructura helicoidal formado por miles de copias de la flagelina FliC aunque en algunos casos, el filamento del flagelo está formado por más de una flagelina. Las subunidades de flagelina se ensamblan formando un cilindro hueco concéntrico que consta de 11 protofilamentos dispuestos paralelos al eje del filamento (Terashima, 2008).

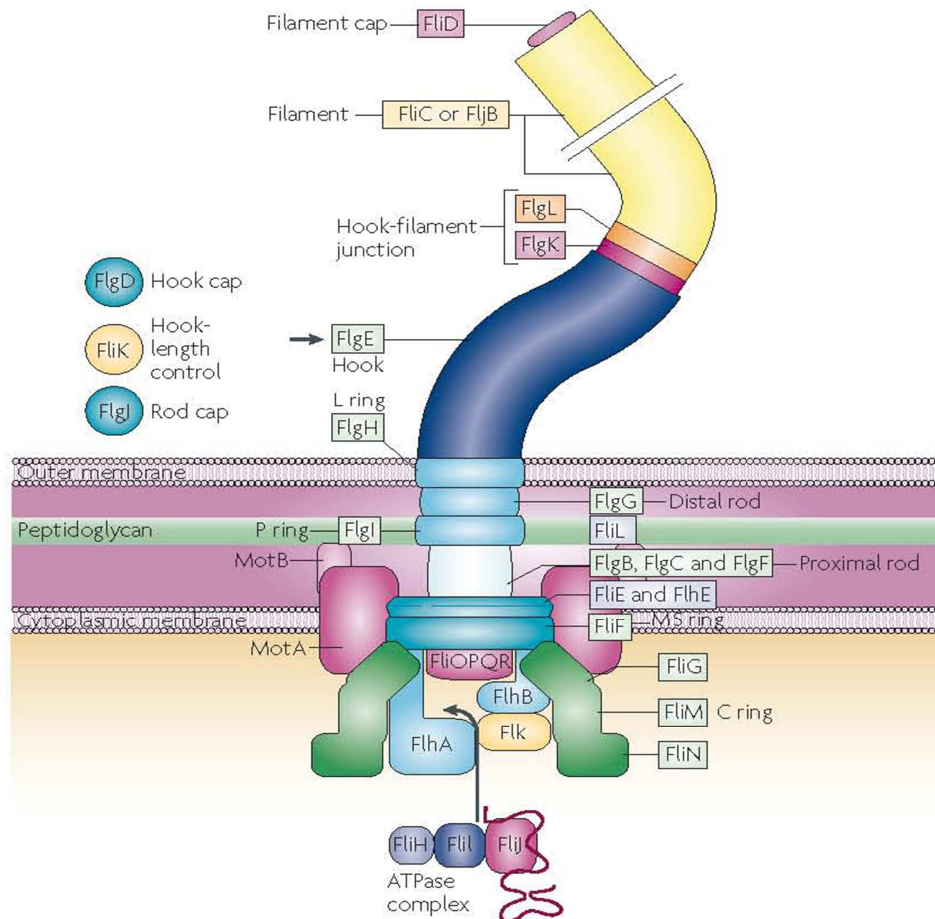


El movimiento se produce cuando con la ayuda de la fuerza protón motriz, el rotor gira y este giro se comunica al cilindro central, se transmite al codo y de éste al filamento. Como el filamento es una hélice rígida, al girar hace avanzar a la bacteria en el medio (Chevance and Hughes, 2008; Smith and Hoover, 2009). En el extremo distal del flagelo se encuentra la *cap protein* o proteína de recubrimiento constituida por cinco monómeros de FliD. El filamento se elonga por este extremo a medida que se van ensamblando los distintos monómeros de FliC, fenómeno que ocurre justo debajo de FliD (Minamino, 2013).

Para la formación de las distintas estructuras del flagelo, las proteínas flagelares requeridas para cada una de ellas deben ser exportadas desde el citoplasma hasta la zona de crecimiento de la correspondiente estructura. Las proteínas a exportar poseen una secuencia polipeptídica en el extremo N-terminal que es específicamente reconocida por el sistema de secreción tipo III, encargado de su secreción. Este aparato de exportación está formado por siete proteínas de membrana: FlhA, FlhB, FliF, FliO, FliP, FliQ, y FliR, y tres proteínas solubles: FliH, FliI, y FliJ. Además, éste es capaz de discernir entre las proteínas necesarias para la estructura y ensamblaje del cuerpo basal y gancho de aquellas requeridas para la formación del filamento gracias a las chaperonas específicas de sustrato, así, el exporte de FlgK, FlgL, FliC, y FliD (específicas del filamento), requieren de: FlgN para FlgK y FlgL, FliS para FliC y FliT para FliD. De este modo, estas chaperonas, además de dirigir a sus sustratos afines hasta el sistema de exportación, los protegen tanto de la degradación como de la agregación en el citoplasma (Chevance and Hughes, 2008; Minamino, 2013).

La síntesis del flagelo bacteriano es un proceso complejo que implica la actividad de docenas de genes estructurales y reguladores. La organización de los genes flagelares varía entre especies; en algunas, éstos se encuentran dispuestos dentro de operones agrupados juntos en el cromosoma (*Sinorhizobium meliloti*), mientras que en otras están dispuestos en más de 20 operones dispersos por todo el genoma (*Helicobacter pylori*). Aunque los genes implicados en la biosíntesis flagelar están muy conservados entre especies bacterianas, el regulador maestro y los mecanismos reguladores que los controlan son divergentes (Patrick and Kearns, 2012; Smith and Hoover, 2009). La síntesis y ensamblaje de flagelos implica un elevado coste energético

celular (2-3% de la energía total de la que dispone la célula) y por ello estos procesos están bajo un estricto control de regulación génica.

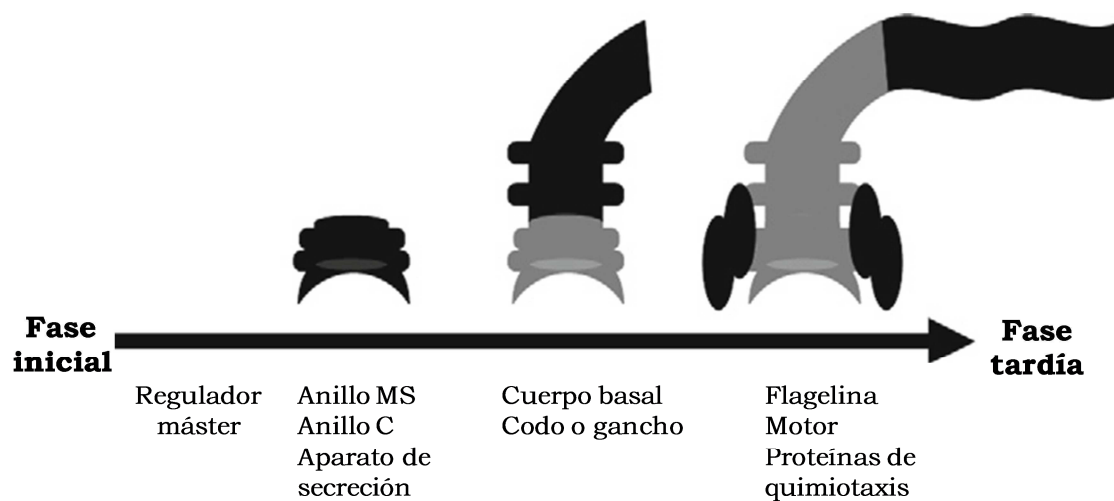


**Figura 2.** Esquema general de las estructuras básicas del flagelo y detalle de los componentes flagelares de *Salmonella enterica* serovar typhimurium. Tomado de Chevance and Hughes (2008).

En enterobacterias, más de 50 genes están implicados en el ensamblaje de flagelos, movilidad y quimiotaxis. Estos genes, a cuyo conjunto se conoce como regulón flagelar, están distribuidos en el genoma en cuatro regiones separadas. El ensamblaje del flagelo es un proceso altamente ordenado y en la mayoría de las bacterias flageladas, dichos genes se transcriben de forma jerárquica y ordenada en función de las necesidades durante el ensamblaje. La regulación temporal de los genes flagelares asegura el adecuado orden en la síntesis de las proteínas necesarias para el ensamblaje del flagelo, ya que deben ser sintetizadas a medida que se vayan necesitando. La expresión secuencial de genes flagelares se logra a través de la integración de redes

reguladoras que controlan la expresión de los diferentes conjuntos de genes flagelares (Smith and Hoover, 2009).

En la biosíntesis del flagelo, primero ha de generarse el cuerpo basal, seguido del gancho y finalmente el filamento (fig.3). El regulador máster integra la información que le llega del medio ambiente, éste activa la expresión de los genes flagelares mediante una cascada reguladora que controla la expresión de varios grupos de dichos genes. Esta cascada además responde a determinados puntos de chequeo en la biosíntesis del flagelo de forma que se coordina la expresión génica con el proceso de ensamblaje.



**Figura 3.** Ensamblaje del flagelo en bacterias Gram-negativas. El control temporal de los genes flagelares asegura que los distintos genes se expresen a medida que sus productos van siendo requeridos en el ensamblaje. La correcta finalización del cuerpo y del gancho es un punto clave en dicha coordinación en muchas bacterias. Modificado de Smith y Hoover (2009).

De acuerdo al orden secuencial de su expresión los genes del regulón flagelar de enterobacterias se distribuyen en 3 clases:

- Clase I: compuesta de los genes *flhD* y *flhC* que se transcriben como un operón bicistrónico y que codifican las subunidades del regulador máster (FlhD4C2). Dicho regulador máster es un activador transcripcional global que regula la expresión de los genes de la clase II.
- Clase II: en ella se incluyen los genes que codifican las proteínas del cuerpo basal del flagelo, los componentes del sistema de secreción tipo III (T3SS), las proteínas del gancho flagelar, así como las proteínas reguladoras FliA y FlgM. FliA codifica el factor  $\sigma^{28}$  necesario para la

transcripción de los genes de la clase III, mientras FliM codifica un factor anti-sigma.

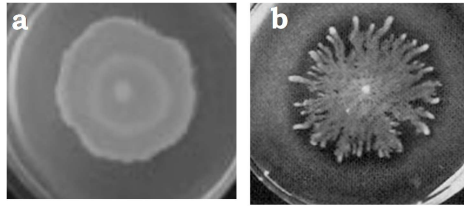
- Clase III: esta última clase está constituida por los genes que codifican la flagelina (*fliC*), motor del flagelo (*mot*) y genes de quimiotaxis (*che*) (Patrick and Kearns, 2012)

## 2. Características del *swarming*.

El *swarming* es un movimiento poblacional mediante el cual las bacterias pueden moverse de forma rápida y coordinada impulsadas por la rotación flagelar sobre una superficie permitiéndoles colonizar nuevos nichos.

Este movimiento se caracteriza porque generalmente lleva asociado un proceso de diferenciación a células elongadas e hiperflageladas denominadas células *swarmer*, requiere la mediación de flagelos, se da en presencia de una capa delgada de fluido sobre la superficie y suele requerir la producción de compuestos surfactantes que actúan reduciendo la tensión superficial del medio y la fricción entre las células y cuya producción suele estar controlada por quorum sensing (QS) (Daniels *et al.*, 2006; Henrichsen, 1972; Kearns, 2010). En este tipo de movilidad se consideran estímulos críticos la densidad celular, el contacto con la superficie que inhibe la rotación flagelar y señales fisiológicas, además del alineamiento celular y la producción de factores de migración que facilitan la translocación de la población bacteriana.

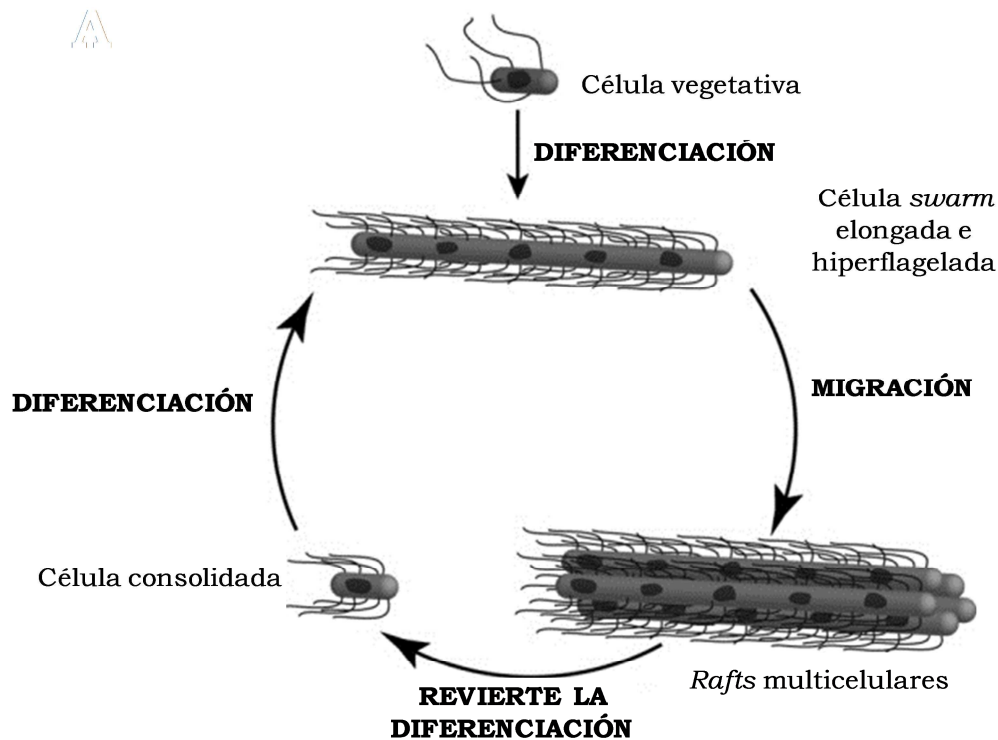
El *swarming* se pone de manifiesto cuando sobre la superficie en la que se hallan las bacterias existe una fina capa de líquido (medios de laboratorio con un contenido en agar del 0.4-1.2%) y lo presentan géneros típicamente flagelados como *Proteus* (fig. 4a), *Pseudomonas* (fig. 4b), *Vibrio*, *Bacillus* y *Clostridium*; en menor medida lo encontramos en *Serratia*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Rhodospirillum*, *Azospirillum*, *Aeromonas*, *Yersinia*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* (Allison *et al.*, 1994; Covelli *et al.*, 2013; Fraser and Hughes, 1999; Kearns, 2010).



**Figura 4.** Imagen macroscópica de colonias *swarming* de *Proteus mirabilis* (a) y *Pseudomonas aeruginosa* (b).

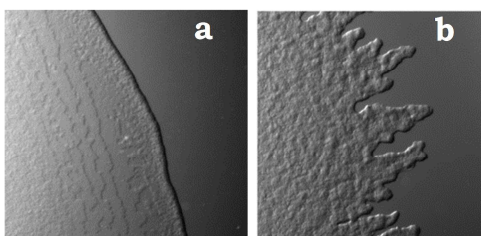
Además, dentro del grupo de bacterias que hacen *swarming* podemos diferenciar entre aquellas que lo realizan independientemente del medio y de la concentración de agar usados, como es el caso de *Azospirillum*, *Rhodospirillum* y diferentes especies de *Vibrio* y *Proteus*, denominados *strong swimmers* (o robustos *swimmers*) que pueden moverse en medios con una alta concentración de agar (1.5-2.5%) y cuyo *swarming* lleva asociado una notable diferenciación celular, iniciada por la restricción de la rotación flagelar y de otras señales inductoras. Y los denominadas *weak* o *swimmers* moderados como *Serratia marcescens*, *Serratia liquefaciens*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, y *Yersinia enterocolitica*, que muestran un *swarming* altamente dependiente del medio y de la concentración de agar usada (0.5- 0.8%) y que no sufren una hiperflagelación tan llamativa como las anteriores (Partridge and Harshey, 2013a, b; Rashid and Kornberg, 2000).

La diferenciación a célula *swarmer* (o *swarm*) se caracteriza porque las células vegetativas del margen de la colonia se vuelven hiperflageladas y sufren una elongación celular. Estas células elongadas migran alineadas entre sí formando grupos denominados *rafts* que se alejan de la colonia envueltos por una matriz extracelular que facilita dicho movimiento al actuar como surfactante. Cuando la migración cesa (consolidación), las células consolidadas continúan el ciclo elongándose nuevamente o reversionan a célula vegetativa (fig. 5) (Alavi and Belas, 2001; Jones *et al.*, 2004; Rather, 2005; Tuson *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Etapas de diferenciación a célula *swarmer*, migración y consolidación del *swarming* en *P. mirabilis*. Modificado de Tuson y colaboradores (2013).

En *P. mirabilis* se ha visto un patrón de crecimiento *swarming* que consiste en la formación de anillos concéntricos de expansión. Estos anillos se producen al alternarse fases de migración (fig. 6a), llevada a cabo por las células *swarmer* del borde de la colonia y fases de consolidación (fig.6b). Durante la fase de consolidación la colonia no se expande, estando compuesta por células no móviles que van quedando en las zonas interiores de los anillos de expansión. Estas células consolidadas presentan características morfológicas similares a las de las células vegetativas (Morgenstein *et al.*, 2010; Rauprich *et al.*, 1996; Tuson *et al.*, 2013).



**Figura 6.** Imágenes de microscopio de campo claro del borde de la colonia *swarming* de *P. mirabilis* durante la fase de migración (a) y de consolidación (b) (Tuson *et al.*, 2013).

La matriz extracelular que envuelve a las células *swarmer* proporciona un entorno suficientemente hidratado para facilitar el desplazamiento. Esta matriz está compuesta por péptidos, proteínas, polisacáridos y biosurfactantes que reducen la tensión superficial y facilitan el movimiento por disminuir la

fricción de las células bacterianas entre sí y con la superficie. Una segunda función para la matriz extracelular podría ser la de actuar como señal para la diferenciación a célula *swarmer* (Toguchi *et al.*, 2000).

El *swarming* es una movilidad compleja no sólo por lo descrito anteriormente, sino por estar influenciada por un elevado número de genes diferentes. Diversos estudios de expresión génica global y mutagénesis al azar en diferentes bacterias han permitido la identificación de genes esenciales para el *swarming*. En estudios de mutatecas de *S. typhimurium*, *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* se han visto alteraciones sustanciales en rutas metabólicas y en la expresión génica relacionada con virulencia, secreción, adquisición de hierro, quimiotaxis, biosíntesis de componentes de la superficie celular, reguladores y otros de función desconocida, indicando que la diferenciación a célula *swarmer* representa mucho más que un fenotipo asociado a la forma de desplazarse por el medio (Inoue *et al.*, 2007; Overhage *et al.*, 2008).

En *P. aeruginosa* se sabe que, en general, la población de células localizadas en el borde de la colonia *swarmer* presenta una represión de los genes asociados con virulencia y una activación de los genes implicados en el metabolismo energético, sugiriendo que estas células, con mayor capacidad para moverse, buscan la colonización de superficies. Por otro lado, las células presentes en el centro de la colonia parecen estar en un estado de vida sésil simulando el estado de células pertenecientes a una biopelícula (Tremblay and Deziel, 2010).

Pese a todo lo anterior, la diferenciación celular no es condición imprescindible para que el *swarming* tenga lugar. En *P. aeruginosa* PAO1 se ha hecho un estudio morfológico mediante visualización microscópica de células recogidas del borde de colonias crecidas en un medio que promueve su movimiento a alta concentración de agar (1.5%) y se ha comparado con células recogidas del borde de colonias (no móviles) crecidas en medio LB a la misma concentración de agar. La visualización microscópica de ambos tipos celulares no ha mostrado diferencia alguna en cuanto a longitud de las células o número y localización de flagelos. El estudio mutacional posterior, ha permitido corroborar que el movimiento observado en el medio promotor es un movimiento totalmente dependiente de flagelos y de ramnolípidos, demostrando la existencia de *swarming* sin diferenciación morfológica en *P.*

*aeruginosa* PAO1, al menos en estas condiciones de ensayo (Takahashi *et al.*, 2008). En *Salmonella* tampoco se observa una diferenciación llamativa, no aumenta el número de flagelos y presenta una ligera elongación celular, a nivel de expresión génica tampoco parece existir grandes diferencias en superficie entre condiciones *swarming* y de no *swarming* (con alta concentración de agar). Sin embargo, sí aparecen grandes diferencias cuando se compara el transcriptoma entre medio líquido y superficie (Partridge and Harshey, 2013a; Wang *et al.*, 2004).

En *Bacillus subtilis* se han observado células *swarmer* binucleadas (Kearns and Losick, 2003), al igual que en *Salmonella*, donde la ligera elongación celular observada parece ser debida a la supresión de la división celular por lo que aparecen dos núcleos por célula *swarm*, pero sin la constricción de la pared celular. Dicha supresión de la división celular parece ser un fenómeno relacionado con la superficie, ya que también aparece en condiciones no inductoras de *swarming* (con alta concentración de agar). Este fenómeno no está relacionado con el regulón de movilidad, ya que mutantes y no mutantes en *flhDC* muestran similar longitud celular (Partridge and Harshey, 2013a).

## **2.1 Desafíos del *swarming*.**

Para que el *swarming* tenga lugar, las bacterias deben superar una serie de “desafíos” que dificultan, o a veces impiden, el inicio de este tipo de translocación en superficie y que conlleva una diferente adaptación en función de las condiciones del medio (esquema resumen en fig.7).

Al igual que en el *swimming*, durante la movilidad *swarming* los flagelos empujan el agua circundante para impulsar a la célula, convirtiéndose ésta en un elemento crítico para este tipo de translocación. El agua queda retenida en el agar y no está disponible en la superficie, por lo que el reto más importante para las bacterias es atraer el agua suficiente a la superficie para sumergir completamente las células. Así, la sensibilidad del *swarming* a las condiciones de humedad se explica por la necesidad de agua (Harshey, 2003; Kearns, 2010). Estudios comparativos realizados entre diversas bacterias Gram-negativas durante su crecimiento en superficie como *P. mirabilis*, ponen de manifiesto un incremento en la síntesis de osmolitos, polisacáridos, lipopolisacáridos (LPS) y otras sustancias aún no identificadas, así como una mayor expresión de sistemas de transporte de solutos que sugieren que dichos



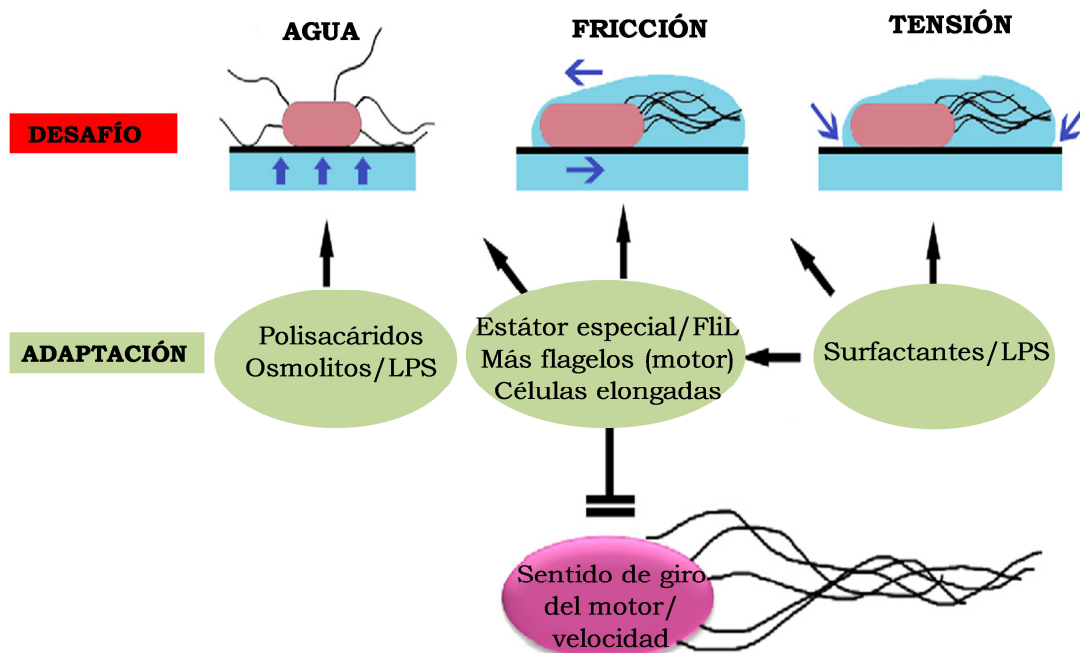
compuestos son liberados al medio para obtener agua y que el *swarming* tenga lugar (Partridge and Harshey, 2013b). Se ha visto en *Salmonella* que la adición de osmolitos suprime el defecto en *swarming* de mutantes *che* y estimula el flujo de agua del agar hacia la superficie (Partridge and Harshey, 2013a).

Vencer la fuerza electroestática de fricción que la superficie ejerce en contra del movimiento celular es el segundo obstáculo a superar. La magnitud de esta fuerza depende de las propiedades del material constituyente de la superficie y de si es seca, viscosa o está lubricada. Una vez que las bacterias están sumergidas en el fluido su movimiento produce un arrastre viscoso que genera una fricción adicional que dificulta el avance.

Actualmente no hay medidas de la magnitud que las fuerzas anteriormente descritas generan en contra del *swarming*, pero una célula elongada podría experimentar menor intensidad de estas fuerzas al minimizar la fricción del fluido asociada con los objetos en movimiento y/o la alineación longitudinal de las células en *rafts* (Partridge and Harshey, 2013b). En *E. coli*, se ha visto que las células elongadas unidas formando *rafts* se mueven de forma más consistente y son desviadas con dificultad (Darnton *et al.*, 2010). Al unirse las células, se genera un mayor movimiento de torsión lo que permite superar la tensión superficial del medio. Así, tanto el aumento de flagelos como proteínas FliL (que aumentan la potencia del motor), son posibles adaptaciones para superar la fricción y la tensión que la superficie ofrece. De este modo, modestos cambios de morfología celular, como el que sufre *Salmonella* durante el *swarming*, reflejan las condiciones del medio, ya que el crecimiento en agar suave presenta menor fricción superficial al desplazamiento (Partridge and Harshey, 2013a). En *P. mirabilis* a pesar de que no se ha visto una correlación obvia entre la mayor longitud celular y la movilidad, ésta podría estar involucrada en la coordinación y direccionalidad del movimiento y en la resistencia a la respuesta inmune (Tuson *et al.*, 2013). Otro mecanismo empleado por bacterias para superar la resistencia que la fricción opone al movimiento consiste en lubricar la superficie en contacto con la célula y reducir la carga, para ello liberan al medio polímeros que se unen a la superficie como LPS o ECA (antígeno común de enterobacterias).

Una vez superado el primero de los dos obstáculos e iniciado el movimiento, el fluido al moverse genera una tensión superficial debido a la tendencia del agua a unirse entre sí, impidiendo la humectación del territorio aún sin colonizar del frente de avance de la colonia. Este tercer impedimento es

superado bien mediante el desplazamiento en un sustrato con baja tensión superficial o mediante la producción de surfactantes por parte de las bacterias, siendo dicha producción mediada por quorum sensing QS (Partridge and Harshey, 2013b).



**Figura 7.** Esquema resumen de los desafíos iniciales que dificultan el *swarming* y las distintas adaptaciones empleadas para vencerlos. Modificado de Partridge and Harshey (2013).

Los surfactantes son moléculas anfipáticas que poseen tanto grupos polares como grupos apolares, por ello, al ir acumulándose en la superficie, reducen la tensión superficial entre el sustrato y las células bacterianas facilitando el movimiento de las células sobre una superficie. La estructura química de los biosurfactantes varía mucho entre las distintas especies de microorganismos y pueden ser de bajo peso molecular o de alto peso molecular. Ejemplos de la producción de moléculas biosurfactantes son los lipopéptidos surfactina y serrawetina producidos por *B. subtilis* y *S. liquefaciens* o los ramnolípidos (glicolípidos) producidos por *P. aeruginosa*. Adicionalmente, se ha visto que mutantes en genes implicados en la biosíntesis de surfactantes son incapaces de moverse sobre una superficie, y en general, cuando estas moléculas son purificadas y añadidas de manera exógena, su fenotipo *swarming* se restaura (Caiazza *et al.*, 2005; Lindum *et al.*, 1998).

El hecho de que muchas especies bacterianas muestren este tipo de movilidad en el laboratorio y que posean diferentes mecanismos y adaptaciones (fig.7)

para superar los impedimentos que la superficie ofrece, demuestra que el *swarming* es un movimiento muy complejo y que constituye una importante forma de invadir territorio en los hábitats naturales bacterianos.

## **2.2 El papel de los flagelos en *swarming*.**

El número de flagelos, su localización y su organización suele diferir entre las distintas especies bacterianas. La razón de estas variaciones aún se desconoce. Igualmente, en aquellas bacterias en las que se ha descrito *swarming*, se ha visto que el tamaño de las células *swarmer* y número de flagelos suele ser diferente. Por ejemplo, *P. mirabilis* y *Vibrio parahaemolyticus*, se caracterizan por presentar células *swarmer* elongadas y con mayor número de flagelos. Por otro lado, se ha visto que las células *swarmer* de *B. subtilis* no exhiben cambios en el tamaño de la célula, pero sí mayor número de flagelos.

La síntesis, ensamblaje y actuación de estas estructuras filamentosas requiere la expresión de un elevado número de genes, por lo que la hiperflagelación durante el proceso de diferenciación a célula *swarmer* debe conferir a la célula una ventaja adaptativa. Tuson y colaboradores observaron en *P. mirabilis* que tanto las células *swarmer* como las células vegetativas con una sobreexpresión artificial de *flhDC*, son más rápidas y mejores colonizadoras de medios viscosos que las células vegetativas normales. Estos resultados sugieren que las diferencias de velocidad entre las células que componen la colonia *swarming* parece ser la responsable del correcto establecimiento de la estructura y organización de éstas (Tuson *et al.*, 2013)

Si las bacterias controlan o no el número de flagelos durante la movilidad *swarming* es un tema controvertido. Existen diversas publicaciones donde se afirma que existe un incremento de la densidad flagelar en las células de *swarming* al ser comparadas con células de *swimming* (Harshey and Matsuyama, 1994; Kearns and Losick, 2003). Otras publicaciones no observan diferencias significativas en la expresión de genes flagelares en análisis transcriptómicos durante el *swarming* (Overhage *et al.*, 2008; Tremblay and Deziel, 2010; Wang *et al.*, 2004) y atribuyen el aparente aumento en el número de flagelos a un ilusión óptica (Harshey, 2010). De hecho, pocos han contado flagelos debido a su dificultad, ya que son filamentos largos que pueden agruparse formando haces, enredarse, cortarse o desprenderse. Más bien, la hiperflagelación celular se deduce del estudio de mutaciones que reducen o

aumentan la movilidad *swarming* con el correspondiente efecto sobre la expresión de genes flagelares (Patrick and Kearns, 2012).

Recientes estudios de *swarming* en *Salmonella* revelan que el número de flagelos por unidad celular no incrementa, pero que sí lo hacen los niveles de FliL y MotAB. FliL, aumenta la estabilidad del cuerpo basal, lo que permite generar mayor fuerza de torsión y facilitar la movilidad en superficie (Partridge and Harshey, 2013a).

Aunque no se conocen la mayoría de las señales y genes de las rutas de señalización que participan en la diferenciación a célula *swarmer*, parece ser que la detección de una superficie, la inhibición de la rotación flagelar y detectar la existencia de humedad son estímulos cruciales que disparan este proceso. Los reguladores máster flagelares parecen definir el número de flagelos a través del control que ejercen sobre el nivel de expresión de los genes implicados en el ensamblaje y componentes del cuerpo basal flagelar (Patrick and Kearns, 2012). En enterobacterias, como *Proteus*, se ha visto que el incremento de la expresión del regulador máster flagelar flhDC es clave en el proceso de diferenciación a célula *swarmer* ya que integra múltiples señales medioambientales y da lugar a la expresión de genes implicados en la síntesis de surfactantes y sistemas de regulación por QS. Además, una sobreexpresión artificial de éste da lugar a una diferenciación prematura, hiperflagelación y una mayor velocidad durante el *swarming* (Fraser and Hughes, 1999; Furness *et al.*, 1997). Dicha inducción también da lugar a la aparición de células *swarmer* en condiciones no inductoras en *S. liquefaciens* (Eberl *et al.*, 1999). En *V. parahaemolyticus* se ha visto que el flagelo polar actúa como un mecanosensor. La inhibición de la rotación del flagelo polar induce la expresión y ensamblaje de los flagelos laterales llevando a la diferenciación de células que muestran movilidad *swarming* (McCarter *et al.*, 1988). Es más, en *P. mirabilis* se ha visto que sus células planctónicas se diferencian en células que presentan movilidad *swarming* cuando la rotación del flagelo es inhibida por el sustrato al estar en contacto sobre una superficie y al contrario, las células *swarmer* de *P. mirabilis* se diferencian en células planctónicas en cuanto son transferidas a medio líquido, probablemente como resultado de la pérdida del estímulo que produce la superficie (Rather, 2005). En *S. typhimurium* los flagelos detectan condiciones inadecuadas de humedad externa interfiriendo en la correcta secreción de subunidades de flagelina, de este modo se inhibe el crecimiento del filamento. Esto ocurre a través del

bloqueo del sistema de exporte de clase III, ya que se inhibe la secreción del factor anti- $\sigma$  FlgM. Durante el *swarming*, se ha visto una secreción continua al medio de FlgM, sugiriendo así una función de regulación directamente implicada en el control de la longitud del flagelo (Wang *et al.*, 2005).

Durante el *swarming* se liberan al medio surfactantes que reducen la resistencia de las células con la superficie durante el avance facilitando el movimiento. Teniendo en cuenta la relación funcional entre movilidad impulsada por flagelos (*swarming*) y la producción de surfactante, se podría esperar una co-regulación de estos procesos que tendría lugar durante la biogénesis flagelar, pudiendo existir una regulación adicional para la entrada y salida de sustancias implicadas en movilidad (Xu *et al.*, 2012).

En *Pseudomonas syringae*, la siringofactina, cuya síntesis no se co-regula con la del flagelo, es el surfactante más relevante en la movilidad *swarming* de esta bacteria. Se ha visto que, además de esta molécula, también se produce 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) ácido alcanoico (HAA, precursor lipídico de los ramnolípidos), que es un surfactante de naturaleza lipídica cuya producción se regula de forma coordinada con la última etapa de la síntesis flagelar, cuando se codifica la flagelina. Mutaciones en genes implicados en el inicio del ensamblaje del flagelo inhiben o reducen la producción de HAA, mientras que mutaciones en genes de la flagelina o implicados en la glycosilación de ésta, incrementan la producción de este surfactante, existiendo una regulación coordinada entre el ensamblaje del flagelo y la producción de dicho compuesto. Por otro lado se ha visto también un incremento en la producción de estos surfactantes al entrar en contacto con superficies porosas, por lo que podrían contribuir a la colonización del sustrato en la naturaleza. Mediante la co-regulación entre la expresión de surfactantes (como los HAA) y la síntesis flagelar se favorece la lubricación de la superficie de desplazamiento y del flagelo por lo que se minimiza el riesgo de rotura de estos. Por otro lado, si los flagelos son utilizados como sensores de la superficie, tal y como apuntan diversos estudios, y la síntesis de flagelina *per se* es un indicativo de las condiciones externas en las que la producción de biosurfactantes sería beneficiosa, entonces, la coordinación de ambos procesos contribuiría a una respuesta eficaz ante estas condiciones (Burch *et al.*, 2012).

### **2.3 Señales extracelulares desencadenantes del *swarming***

La densidad celular desempeña un papel clave en *swarming*: el inicio y mantenimiento de esta movilidad requiere que haya un número mínimo de individuos. Este requerimiento induce ya a pensar que señales químicas extracelulares de QS deben jugar un papel importante en este proceso. Además, condiciones nutricionales como la concentración de hierro presente en el medio, péptidos y aminoácidos, ácidos grasos, poliaminas o distintos compuestos presentes en la matriz extracelular se ha demostrado ser estímulos capaces de desencadenar el *swarming* en distintas bacterias (Daniels *et al.*, 2004; Harshey, 2003; Verstraeten *et al.*, 2008). Estas señales son detectadas y transmitidas mediante sistemas reguladores de dos componentes y/o reguladores citosólicos.

En *P. mirabilis*, la putrescina y la glutamina actúan como señales extracelulares que inducen la diferenciación a célula *swarmer*. Normalmente, *P. mirabilis* es incapaz de diferenciarse en medio mínimo, en presencia de glutamina esta diferenciación sí ocurre (Allison *et al.*, 1993).

#### *2.3.1 Señales químicas extracelulares: Quorum sensing (QS)*

Las bacterias son capaces de regular la expresión génica en función de la densidad de la población mediante la producción y detección de señales moleculares que les permiten iniciar una acción concertada al alcanzarse una concentración poblacional umbral. Este fenómeno de regulación génica descrito inicialmente en las bacterias bioluminiscentes *Vibrio fischeri* y *V. harvey* (Fuqua *et al.*, 1994) es conocido como quorum sensing (QS) o percepción del quorum (número de individuos necesarios para que la población lleve a cabo la expresión conjunta de un grupo de genes). En la percepción del número de individuos juegan un papel clave compuestos difusibles de bajo peso molecular conocidos como señales QS o autoinductores. Las señales de QS más ampliamente utilizadas por bacterias Gram-negativas son las acil-homoserina lactonas (AHLs), compuestos caracterizados por presentar un anillo homoserina conservado conectado a un grupo acilo variable. (Miller and Bassler, 2001).

La detección de la densidad celular mediante QS permite la óptima diseminación bacteriana desde un medio con alta densidad poblacional hacia

un nuevo nicho ecológico, además es importante para el *swarming*, ya que participa en la producción de biosurfactantes y, en otras bacterias, controla el proceso de diferenciación a célula *swarmer* (Daniels *et al.*, 2004). La información sobre el papel que las AHLs tienen con respecto a la regulación ejercida en el *swarming* es aún limitada. Lo que sí se sabe de estas señales es, que en este tipo de translocación en superficie, actúan de manera diferente en distintas especies bacterianas y que pueden cumplir otras funciones (Verstraeten *et al.*, 2008). Se ha visto, por ejemplo, que en *Rhizobium etli*, las AHLs (que contienen en su estructura un ácido graso de cadena larga), además de actuar como señales de QS, funcionan también como biosurfactantes que facilitan la migración celular (Daniels *et al.*, 2006). La serrawetina o los ramnolípidos (producidos por *S. liquefaciens* y *P. aeruginosa* respectivamente), constituyen ejemplos de biosurfactantes relevantes para el *swarming* regulados por QS (Daniels *et al.*, 2004). Recientemente se ha visto que de las distintas AHLs (producto de la actividad AHL sintasa SinI) producidas por *S. meliloti* Rm8530, tan solo dos de ellas (C<sub>16:1</sub> y 3-oxo-C<sub>16:1</sub> HL), participan en la movilidad *swarming* al inducir la expresión de genes implicados en la síntesis de EPS II (Gao *et al.*, 2012). Estudios llevados a cabo en *P. aeruginosa* han puesto de manifiesto que mutantes defectuosos en QS son incapaces de presentar *swarming* cuando crecen sobre la superficie de un medio de agar cuya fuente de carbono es succinato; sin embargo, cuando el medio contiene glutamato, estos mutantes no muestran defectos en este tipo de movilidad, por lo que el control por QS sobre el *swarming* de esta bacteria está condicionado por los nutrientes presentes en el medio (Shrout *et al.*, 2006).

### 2.3.2 Condiciones nutricionales

Cada especie bacteriana en el laboratorio necesita unas condiciones físicas y químicas adecuadas, así como requerimientos nutricionales específicos para que el *swarming* tenga lugar. Las hay, como *B. subtilis*, que son capaces de moverse en una gran variedad de medios ricos, otras, como es el caso de *Salmonella enterica* y *Yersinia enterocolitica* requieren la adición de suplementos particulares como glucosa (Kearns, 2010; Rauprich *et al.*, 1996). Un medio rico en nutrientes generalmente estimula la diferenciación a célula *swarmer*, ya que se necesita mucha energía para llevar a cabo este tipo de movilidad. Sin embargo, existen excepciones a esto, ya que se ha visto en *P.*

*aeruginosa* un incremento de esta movilidad en condiciones limitantes de nitrógeno y en presencia de determinados aminoácidos (Overhage *et al.*, 2008). Se ha visto también en esta bacteria que el exceso de hierro inhibe el *swarming*, lo que sugiere que las condiciones nutricionales desfavorables lo estimulan (Deziel *et al.*, 2003).

La concentración intracelular de calcio determina el comportamiento quimiotáctico de ciertas bacterias. En *V. parahaemolyticus*, altas concentraciones de calcio y bajas de hierro, promueven la expresión de genes de flagelos laterales, el *swarming* y el regulón T3SS, que es un sistema de secreción de tipo III usado para inyectar efectores de virulencia en el hospedador (Gode-Potratz *et al.*, 2010).

Una de las señales extracelulares implicadas en el control del *swarming* es la concentración de hierro presente en el medio. Este elemento es esencial para las bacterias, no sólo en movilidad, sino que es requerido en el mantenimiento celular, funciona como cofactor de muchas enzimas, y es importante en el metabolismo del ARN y el ADN. Sin embargo, su exceso puede ser tóxico debido a que promueve la generación de radicales libres que pueden dañar el ADN, las proteínas y la membrana celular de la bacteria.

En anaerobiosis, el hierro presente se encuentra en su forma insoluble como  $\text{Fe}^{3+}$ , el conseguir el hierro presente en medio y metabolizarlo en su forma asimilable constituye una ventaja adaptativa que garantiza la supervivencia celular. Para ello, las bacterias han desarrollado distintos mecanismos que promueven la adquisición de hierro y posterior conversión de éste a su forma asimilable ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Una de las estrategias empleadas por las bacterias para la captura de  $\text{Fe}^{3+}$  del medio, consiste en secretar y capturar unas moléculas quelantes de hierro de bajo peso molecular denominadas sideróforos. Pero estos no pueden penetrar libremente a través de las porinas de la membrana extracelular de bacterias Gram-negativas, de modo que se requieren receptores de membrana externa y de sistemas de entrada y transporte (Sandy and Butler, 2009). La producción de estos sideróforos está regulada por la disponibilidad de hierro en el medio. Bajas concentraciones de este compuesto dan lugar a su producción y altas concentraciones la bloquean.

Ya que la disponibilidad de hierro está ligada a la producción de sideróforos, no es sorprendente que en algunas bacterias se haya observado que la producción de estos puede ser clave en los procesos asociados a superficie.



Se ha visto que tanto la pioverdina o la pioquelina (sideróforos producidos por diversas especies de *Pseudomonas*), así como la enterobactina producida por *E. coli*, son requeridos para la movilidad en superficie y la formación de biopelículas (Banin *et al.*, 2005; Inoue *et al.*, 2007; Matilla *et al.*, 2007; May and Okabe, 2011). En *E. coli* K-12, las condiciones requeridas para que el *swarming* tenga lugar también conllevan la inducción de los genes de biosíntesis y transporte del sideróforo enterobactina (Inoue *et al.*, 2007).

Mutantes afectados en la síntesis del sideróforo de *Pseudomonas putida* KT2440 o en el receptor de membrana del sideróforo FpvA son incapaces de desplazarse sobre una superficie semisólida (Matilla *et al.*, 2007).

Se sabe que la limitación de hierro es la segunda señal inductora de la diferenciación a célula *swarmer* en *V. parahaemolyticus*, siendo la primera señal la restricción del movimiento del flagelo polar (McCarter, 1999). En *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* y en *S. meliloti*, los genes para la obtención y metabolismo de hierro se encuentran significativamente inducidos en medio inductor de *swarming* (agar semisólido) (Nogales *et al.*, 2010; Overhage *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004). Además, se ha demostrado que mutantes de *E. coli*, *P. putida* y *S. meliloti* deficientes en distintos sistemas de captación de hierro, son deficientes en *swarming* (Inoue *et al.*, 2007; Matilla *et al.*, 2007; Nogales *et al.*, 2010).

Recientemente se ha demostrado que en condiciones limitantes de hierro, se produce una inducción temprana de genes cuya expresión dan lugar a la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa*, lo que da lugar a una mayor movilidad en superficie (Glick *et al.*, 2010).

#### **2.4 Relación entre *swarming* y virulencia**

El *swarming* es un tipo de movimiento estrechamente relacionado con la virulencia en numerosas bacterias patógenas.

En patógenos intestinales y urogenitales como *P. mirabilis*, el *swarming* es considerado en sí mismo un factor de virulencia, ya que este movimiento permite la colonización, ascenso por el tracto urinario y formación de biopelículas en los catéteres, de modo que, mutaciones que afectan a esta movilidad, reducen la capacidad infectiva de la bacteria (Allison *et al.*, 1994).

En el proceso de diferenciación a célula *swarmer* de *P. mirabilis*, aunque la hiperflagelación contribuye a una rápida colonización de los tejidos, el incremento de la virulencia durante la diferenciación a célula *swarmer* no se

debe únicamente a esta circunstancia, sino que, más de 50 genes ven alterada su expresión entre los que se encuentran factores de virulencia como ureasa, hemolisina o metaloproteasa.

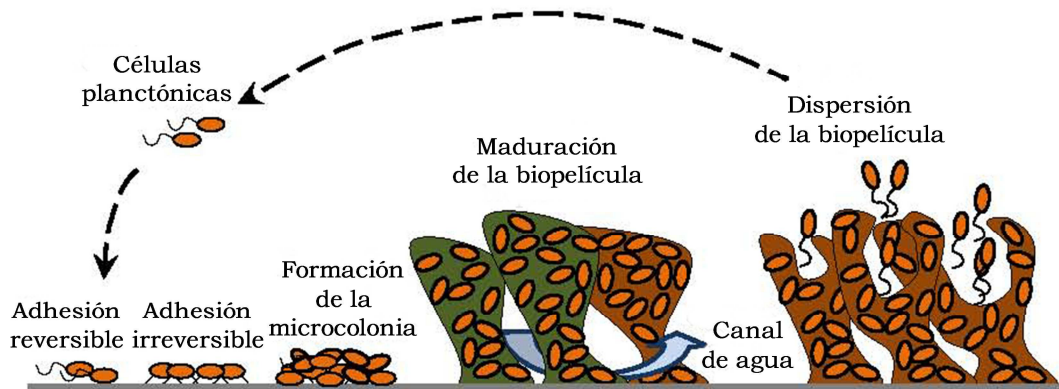
Se acepta en general que el *swarming* es un proceso de adaptación que lleva asociado un incremento en la producción de factores de virulencia en distintos microorganismos. Estudios transcriptómicos realizados en *S. typhimurium* y *P. aeruginosa*, demuestran que la diferenciación a célula *swarmer* va acompañada de incremento en la expresión de una gran variedad de genes relacionados con virulencia como los sistemas de secreción tipo III y los sistemas de captación, transporte y metabolismo del hierro (Overhage *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2004). Además, y como se ha mencionado anteriormente, las células *swarmer* poseen más resistencia a antibióticos que las células planctónicas (Lai *et al.*, 2009). Parece ser que la co-regulación de *swarming* y virulencia se establece mediante la señalización a través de la molécula guanosín-monofosfato-cíclico dimérico (c-di-GMP) (Verstraeten *et al.*, 2008).

### **3. Movilidad y formación de biopelículas.**

La formación de biopelículas y la movilidad, el *swarming* en particular, son dos fenómenos estrechamente relacionados. En general, ambos son procesos multicelulares asociados a la superficie y relacionados con la capacidad infectiva e invasiva de bacterias patógenas.

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos embebidas en una matriz de exopolisacáridos y fuertemente adheridas a una superficie biótica o abiótica (Verstraeten *et al.*, 2008). La formación de la biopelícula ocurre a través de una serie de etapas (fig. 8): 1) La primera de ellas comienza con una unión reversible de las células planctónicas libres al entrar en contacto con la superficie. 2) Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie (ayudada de los flagelos y pili tipo IV), comienza a dividirse, las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión y dan lugar a una microcolonia adherida de forma irreversible. 3) Posteriormente, los grupos de bacterias comienzan a secretar compuestos de naturaleza polisacáridica como exopolisacáridos (EPSs), proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que constituyen la matriz de la biopelícula. 4) Las microcolonias son embebidas en la matriz de polisacáridos dando lugar a una biopelícula madura. 5) Finalmente, algunas bacterias se liberan de la matriz de la biopelícula y colonizan nuevas

superficies cerrando el proceso (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). La figura 8 muestra un esquema de la formación de una biopelícula en bacterias mostrando las etapas explicadas anteriormente.



**Figura 8.** Representación esquemática de las principales etapas del proceso de formación de biopelículas en bacterias. (Amaya-Gómez, 2013).

Una decisión fundamental para las bacterias es la de existir en un estado de vida libre planctónico o de manera sésil formando biopelículas. Los procariontes tienen la capacidad de adaptar la estructura de las biopelículas en respuesta a las condiciones medioambientales, lo que les confiere flexibilidad y una rápida adaptación. Las condiciones hidrodinámicas, nutricionales, la movilidad bacteriana, comunicación intercelular, producción de EPSs y proteínas de superficie y la composición de la matriz son factores determinantes de su estructura (Flemming and Wingender, 2010).

Es importante recordar que la transición entre la movilidad y la formación de biopelículas es un proceso cíclico. Las bacterias móviles que se encuentran con una superficie se someten a una fase de fijación específica que conduce a la secreción del material constituyente de la matriz extracelular. Gracias a la retención de enzimas extracelulares en la matriz de la biopelícula se genera un sistema digestivo externo versátil en donde hay un secuestro de nutrientes particulares y nutrientes disueltos en la fase acuosa, y utilización de estos, como nutrientes y fuente de energía (Flemming and Wingender, 2010). Después de que la biopelícula alcanza un tamaño apropiado, comienza una fuerte competencia intraespecífica dentro de ésta por los nutrientes y/o espacio activándose el proceso de dispersión durante el cual las células planctónicas salen de esta comunidad (Waters, 2013).

La matriz polisacáridica posee distintas funciones, como proveer de estabilidad mecánica a la biopelícula, mediar la adhesión a la superficie de

toda la comunidad celular, dar forma a una red de estructuras tridimensionales interconectadas, y transitoriamente, inmovilizar las células que forman parte de la biopelícula. Además, esta matriz funciona como un escudo que protege la comunidad bacteriana frente a predadores como protozoos y fagos líticos, la desecación, rayos UV, agentes antimicrobianos y respuesta inmune (Flemming and Wingender, 2010; Fux *et al.*, 2005)

Diversos estudios revelan la estrecha conexión entre *swarming* y formación de biopelículas. Se ha visto en *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Variovorax paradoxus* y *P. aeruginosa* la existencia de una ruta común que regula de manera inversa ambos procesos. Así, mutaciones que afectan a la formación de biopelículas confieren un fenotipo *hiperswarmer* (Ferreira *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2010; Merritt *et al.*, 2007; Overhage *et al.*, 2007; Pehl *et al.*, 2012; Pratt *et al.*, 2009; Shrout *et al.*, 2006). Quizás, la relación que existe entre deficiencias en movilidad *swarming* y formación de biopelículas se deba a la presencia de factores comunes necesarios en ambos:

- a) El *swarming*, al igual que las biopelículas, son procesos multicelulares asociados a superficie en los que tanto la comunicación intercelular como la regulación por QS tienen una gran influencia.
- b) Estructuras bacterianas asociadas a la envoltura celular como flagelos, pili tipo IV, matriz exopolisacáridica y biosurfactantes están implicadas tanto en *swarming* como en la formación de biopelículas.

En la etapa inicial de formación de las biopelículas las bacterias requieren pili y flagelos y la movilidad en superficie puede favorecer o no la formación de microcolonias, por lo que su papel puede ser crucial en la determinación de la estructura última de la biopelícula (Shrout *et al.*, 2006). En la etapa final del ciclo de formación de biopelículas la movilidad permite la dispersión de las células de la biopelícula.

Por otra parte, no está clara la relación entre formación de biopelículas y producción de biosurfactantes, en algunas bacterias se ha descrito una relación inversa entre ambos procesos. En mutantes afectados en la producción de surfactina de *S. enterica* serovar *thyphimurium*, *E. coli* y *B. subtilis*, o serrawetina de *S. marcescens*, muestran una mayor eficiencia en la formación de biopelículas al igual que se ven afectados en la movilidad en superficie tipo *swarming*. Parece ser que la acción surfactante de estas

moléculas dificulta la formación de biopelículas, ya que la adición exógena de surfactina inhibe la formación de biopelículas en ellos (Mireles *et al.*, 2001). Pamp y colaboradores (2007), demostraron que mutantes deficientes en la síntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* no forman las microcolonias características de las fases iniciales del desarrollo de la biopelícula, dando lugar a estructuras planas poco desarrolladas y a deficiencias de movilidad en superficie. En *Vibrio paradoxus* se ha visto que transposantes afectados en genes de EPS llevan asociado un fenotipo inverso en estos procesos, con una menor movilidad en superficie tipo *swarming* y una mayor capacidad formadora de biopelículas. Esto lleva a pensar a los autores del trabajo que este microorganismo es capaz de adaptarse al ambiente a través de una expresión coordinada de genes implicados en la producción de exopolisacáridos y formación de pili tipo IV entre otros (Pehl *et al.*, 2012).

- c) Finalmente, tanto la diferenciación a célula *swarmer* asociada a *swarming* como la formación de la biopelícula, confieren a las bacterias implicadas una mayor resistencia frente a diversos agentes antimicrobianos (Lai *et al.*, 2009; Overhage *et al.*, 2008).

Se ha visto que la molécula de di-GMPc de señalización intracelular (así como guanilato ciclasas implicadas en su síntesis, con dominios GGDEF, y fosfodiesterasas, con dominios EAL, específicas que lo degradan), actúa como un segundo mensajero en respuesta a señales extracelulares, regulando el comportamiento multicelular, la movilidad y la virulencia. Por lo general, altas concentraciones de c-di-GMP se correlacionan con un incremento de la vida sésil y una reducción de la movilidad y la virulencia (Verstraeten *et al.*, 2008). Existen numerosos ejemplos de este tipo de regulación. En bacterias como *V. cholerae* y en *P. aeruginosa* se ha visto que el c-di-GMP inhibe la movilidad a nivel de la transcripción al reprimir la expresión de los operones implicados en la biosíntesis flagelar. Además, el c-di-GMP en diversas especies bacterianas directamente modula la actividad flagelar uniéndose al dominio PilZ de la proteína YcgR (Waters, 2013). Por otro lado, la proteína BdcA ha sido descrita en *E. coli* como proteína dispersadora de biopelículas capaz de unirse al di-GMPc y disminuir su concentración, pero sin actuar como fosfodiesterasa (Ma *et al.*, 2011a). Al reducir la concentración de este segundo mensajero incrementa la movilidad y la producción de DNA extracelular y disminuye la producción de EPS, la longitud celular y la agregación, lo que da lugar a una

dispersión de la biopelícula. Esta actividad no sólo se ha visto en *E. coli*, sino que posteriormente también ha sido observada en *P. aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* y en *S. meliloti* tras la introducción de un plásmido portador del gen mediante conjugación, obteniéndose los mismos fenotipos descritos en *E. coli* (Ma *et al.*, 2011b).

No sólo a través del di-GMPc se da la regulación coordinada entre biopelícula y movilidad. El óxido nítrico (NO) es una molécula señal implicada en multitud de procesos biológicos. En *P. aeruginosa*, es el resultado de la actuación de la enzima nitrito reductasa codificada por *nirS* a partir de nitrito. Se ha visto que el NO producido por las células bacterianas les confiere mayor resistencia frente a un amplio espectro de antibióticos, contribuye a una reducción del estrés oxidativo producido por estos e incluso induce la dispersión de las biopelículas maduras favoreciendo la liberación de células planctónicas *swimming* (de la Fuente-Nuñez *et al.*, 2013). En *P. aeruginosa* PA14, se ha visto implicación directa de esta molécula en movilidad *swarming*, ya que un mutante *nirS* presenta una menor translocación en superficie que la parental, siendo dicho fenotipo complementado con la adición exógena de NO. Igualmente, este mutante fue incapaz de formar biopelículas al verse afectado en las etapas iniciales de la formación de éstas, donde la movilidad juega un papel crucial, dicho fenotipo no fue complementado con la adición exógena de NO. Estos resultados sugieren que la concentración intracelular de NO es crítica para el desarrollo de los fenómenos en superficie, tanto en movilidad como para promover o reprimir la formación de biopelículas (de la Fuente-Nuñez *et al.*, 2013).

#### **4. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.**

Determinadas bacterias del suelo son capaces de establecer simbiosis mutualista con plantas leguminosas al inducir la formación de un nuevo órgano, el nódulo. En el interior del nódulo las bacterias diferenciadas van a llevar a cabo la fijación biológica del nitrógeno (FBN), proceso que permite a la planta crecer en suelos pobres en nitrógeno aprovechando el dimolecular del aire.

Los principales responsables de la fijación simbiótica de nitrógeno son las bacterias comúnmente conocidas como rizobios. Dichas bacterias constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos distribuidos en 12 géneros: *Rhizobium*, *Sinorhizobium* (reclasificado como *Ensifer*), *Mesorhizobium*,

*Bradyrhizobium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Burkholderia*, *Ralstonia* y *Ochrobactrum*.

Los rizobios son bacilos aerobios Gram negativos, móviles no esporulados. Están presentes en el suelo y establecen relaciones simbióticas con plantas de la familia *Fabaceae*, ésta constituye la segunda familia en importancia económica para el hombre después de las gramíneas.

El establecimiento de la simbiosis efectiva fijadora de nitrógeno es el resultado de tres eventos: i) infección intracelular de las células hospedadoras por parte del microsimbionte, ii) desarrollo y organogénesis del nódulo y iii) el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN). El primer y el segundo evento ocurren simultáneamente, mientras que la fijación ocurre después de que la organogénesis está completada y sólo si la infección bacteriana es la adecuada.

La simbiosis efectiva para la fijación de nitrógeno entre planta y bacteria induce en las raíces o en el tallo, la formación de órganos especializados que engloban a las bacterias, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio, una vez que éstas se han diferenciado. El nódulo proporciona el entorno adecuado para que la fijación biológica de nitrógeno atmosférico tenga lugar. Tanto la organogénesis de este nuevo órgano como la infección bacteriana, son dos procesos totalmente distintos y genéticamente separados, sin embargo, para que la formación del nódulo tenga lugar en el sitio de la infección bacteriana, ambos procesos deben ser coordinados tanto espacial como temporalmente (ver fig.9) (Oldroyd *et al.*, 2011). Como resultado de esta interacción, las leguminosas pueden crecer en suelos con bajo contenido en nitrógeno sin necesidad de añadir fertilizantes químicos, permitiendo el desarrollo de una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente. Por otro lado, la bacteria dispone de una fuente de carbono y un nicho ecológico en el que desarrollarse.

La formación de estos nódulos simbióticos requiere el intercambio de señales entre la bacteria y la planta hospedadora estableciéndose un verdadero diálogo molecular entre ellos y cuyo fin es el establecimiento de nuevos patrones morfogénéticos en ambos organismos. La especificidad de esta simbiosis constituye una de sus características principales, cada especie de rizobio es capaz de establecer relaciones simbióticas sólo con determinadas especies de leguminosas, convirtiéndose en hospedadores específicos. Para ello se necesita un reconocimiento mutuo que implica un intercambio de señales químicas

entre ambos organismos. El rango de hospedador es muy diferente entre los distintos rizobios, puede ser amplio como en el caso de *Rhizobium* sp. NGR234, capaz de nodular más de cien géneros distintos de leguminosas o ser más reducido, discriminando entre genotipos dentro de una misma especie de leguminosa. Esta interacción simbiótica posee gran importancia, tanto por su repercusión económica y ecológica, como por representar un modelo de investigación básico para profundizar en el conocimiento de procesos de regulación génica y reconocimiento interespecífico. Por añadidura, los rizobios están relacionados filogenéticamente con numerosos microorganismos patógenos tanto de plantas como de animales. Se acumulan numerosas evidencias que sugieren la utilización de mecanismos similares a los usados por bacterias patógenas en la invasión de hospedadores eucariotas. Por todo lo anterior, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es un modelo de estudio de las bases moleculares de las interacciones planta-bacteria que permite el desarrollo de la biología vegetal y microbiana.

Como se ha mencionado anteriormente, para que el proceso de infección por *Rhizobium* de las raíces de leguminosas tenga lugar, se necesita un reconocimiento previo específico. Los rizobios deben detectar y responder a la presencia de las raíces de la planta hospedadora, así, son capaces de reconocer moléculas aromáticas de bajo peso molecular secretadas por la planta (flavonoides), que inducen la expresión de los genes de nodulación: *nod*, *nol* y *noe*. La composición de la mezcla de flavonoides varía con la especie de la planta y con su estado fisiológico y de desarrollo. Como resultado de esta inducción, se transcriben aproximadamente unas 25 proteínas encargadas de la síntesis y secreción de una molécula señal: el factor Nod (FN) o lipoquitooligosacárido. Estos factores secretados por la bacteria activan múltiples respuestas en la planta hospedadora encaminadas a preparar la invasión bacteriana como la división de determinadas células del córtex y la curvatura del pelo radical (Jones *et al.*, 2007).

La estructura básica del FN es la misma en todas las especies de *Rhizobium* que lo producen: posee un esqueleto oligosacarídico de quitina resultante de la unión de 4-5 restos de N-acetilglucosamina en el que la glucosamina del extremo no reductor está esterificada con un ácido graso. El esqueleto del FN puede sufrir una serie de modificaciones denominadas decoraciones, que varían entre los distintos rizobios y que pueden afectar al citoesqueleto de



quitina (con la aparición de sustituyentes en él), a su longitud y al grado de saturación del ácido graso. Los genes del operón *nodABC* codifican las proteínas requeridas para la síntesis del esqueleto del FN. Los productos del resto de los genes *nod* y los genes *noe* y *nol* se encargan de hacer las modificaciones de los FN, tales como la adición de residuos fucosil, sulfiril, acetil, metil, carbamoil o arabinosil y cambios en la cadena del ácido graso, responsables de la especificidad de hospedador (Jones *et al.*, 2007).

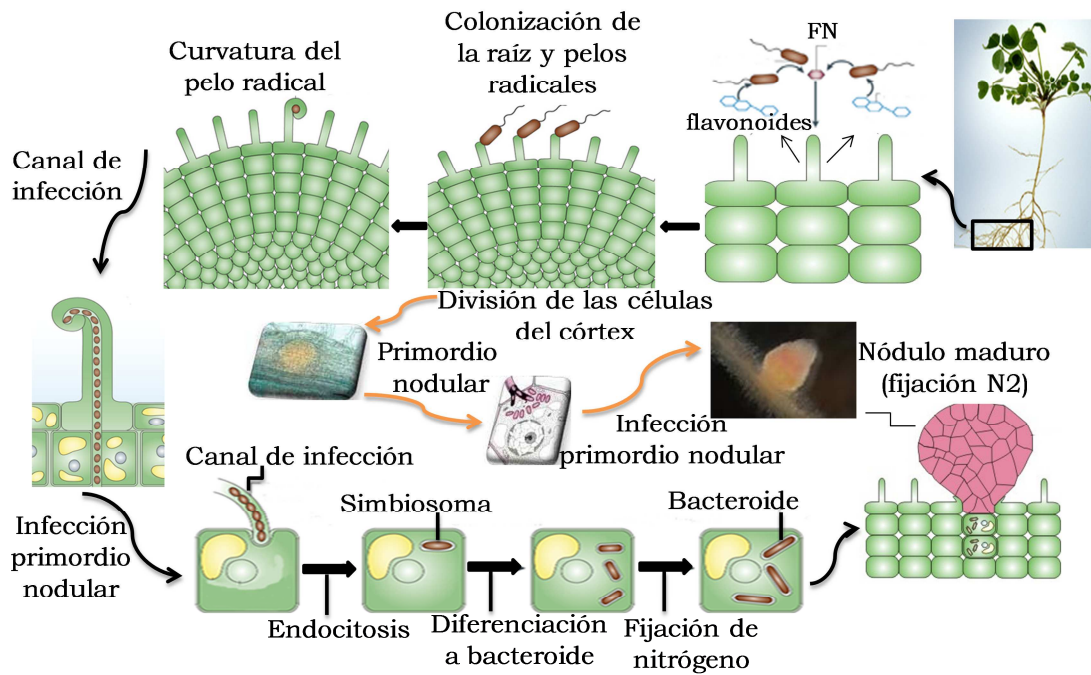
Cada especie bacteriana suele producir varios tipos de factores Nod, que son reconocidos específicamente por los hospedadores compatibles. De este modo, la producción de los FN por parte de la bacteria, constituye el elemento clave para la especificidad de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa que define el rango de hospedadores susceptibles de ser infectados (Perret *et al.*, 2000; Supanjani *et al.*, 2006). Tras el reconocimiento mutuo, se produce la adhesión de la bacteria a las células de la epidermis y principalmente a los pelos radicales de la planta. La fase inicial de este proceso de invasión posee grandes similitudes con el desarrollo de las biopelículas. Al inicio, las bacterias se adhieren superficialmente como células únicas a la raíz de la planta para dar lugar a una unión posterior más firme que permita el acúmulo de bacterias (Hirsch, 2009). Tras el reconocimiento mutuo y la adhesión bacteriana, se dan dos procesos simultáneos y paralelos llevados a cabo por cada uno de los organismos implicados. Por un lado, en la planta se originan una serie de cambios morfológicos encaminados a la síntesis del primordio nodular (nódulo inmaduro); en respuesta a los FN, ciertas células del córtex de la raíz en posición opuesta a los polos del protoxilema entran de nuevo en el ciclo celular y se dividen proliferando activamente y originando un pequeño tumor conocido como primordio nodular (van Brussel *et al.*, 1992). De forma simultánea, los rizobios deben atravesar la epidermis y la corteza de la raíz para poder acceder a éste, una vez allí, las bacterias son liberadas al citoplasma de las células vegetales para llevar a cabo la FBN (ver fig.9).

*Rhizobium* puede llegar al nódulo a través de canales de infección, por medio de “cracks” o fisuras en la epidermis ocasionadas por la emergencia de raíces laterales, o a través de los espacios intercelulares (Oldroyd *et al.*, 2011).

En las leguminosas típicas, los rizobios comúnmente penetran a través de la pared celular de los pelos radicales en crecimiento y quedan envueltos en una estructura tubular conocida como cordón o canal de infección, formado por una matriz de origen bacteriano y glicoproteína de origen vegetal (Brewin,

2004), que progresa hacia la base del pelo radical. Para que esto ocurra, las células bacterianas contactan con el pelo radical e inducen su curvatura envolviendo a los rizobios en su interior. A continuación, tiene lugar la infección propiamente dicha, que comienza con una hidrólisis muy localizada de la pared celular de la planta y la invaginación de la membrana plasmática del pelo radical dando lugar a la estructura tubular típica del canal o cordón de infección. El crecimiento dirigido de los cordones de infección transporta a los rizobios atravesando las distintas capas de las células de la raíz hasta las células del primordio nodular. Se cree que enzimas pectinolíticas y celulolíticas secretadas por la planta hospedadora, la bacteria o ambos simbiosomas van degradando las paredes de las células vegetales a medida que el canal de infección se va formando (Robledo *et al.*, 2008).

Una vez alcanzado el primordio nodular, los cordones de infección se ramifican y, a la vez que continúa el desarrollo del nódulo, se produce la liberación de las bacterias en el citoplasma de las células vegetales. La liberación de las bacterias rodeadas por una porción de membrana de la célula vegetal recibe el nombre de membrana peribacteroidal. En su interior, las células bacterianas son capaces de dividirse, finalmente se produce la diferenciación de las bacterias en formas especializadas en la fijación de dinitrógeno atmosférico llamadas bacteroides. Esta diferenciación suele estar acompañada de un aumento del volumen de la bacteria, así como de un cambio de su morfología de bacilo corto a formas más o menos distorsionadas. Al conjunto constituido por uno o varios bacteroides rodeados por una membrana peribacteroidal se les conoce con el nombre de simbiosoma. Simultáneamente a la aparición de éste, el primordio nodular se convierte en nódulo maduro (Maunoury *et al.*, 2008)

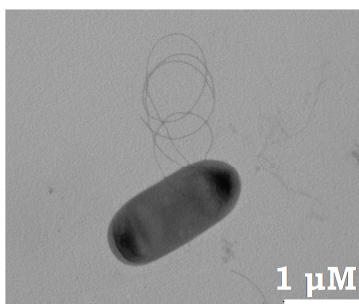


**Figura 9.** Proceso de formación del nódulo en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Modificado de Jones *et al.*, (2007). FN, Factores Nod.

## 5. Aspectos relevantes de la movilidad de *Sinorhizobium meliloti*.

Todo el estudio realizado en este trabajo se ha llevado a cabo con la bacteria *Sinorhizobium meliloti*, ya que es el microorganismo modelo en la interacción *Rhizobium*-leguminosa y se dispone de su genoma secuenciado convirtiéndose en el primer rizobio en ser secuenciado (Galibert *et al.*, 2001). Se trata de una  $\alpha$ -proteobacteria perteneciente a la familia *Rhizobiaceae* y al género *Sinorhizobium* (*Ensifer*) (Lindstrom *et al.*, 2010).

Este microorganismo es un bacilo Gram negativo, aerobio, cuyo tamaño oscila entre 0.5-1  $\mu\text{m}$  de ancho y 1.2-3  $\mu\text{m}$  de largo (fig.10). Posee entre 6 a 8 flagelos periticos que rotan en una única dirección a distintas velocidades, permitiendo a la célula bacteriana cambiar de dirección.



**Figura 10.** Imagen obtenida por microscopía electrónica de transmisión (MET) de GR4 en medio mínimo semisólido (0.6% agar). Este trabajo.

Su genoma tiene un tamaño de 6.7 millones de pares de bases (pb) y está compuesto por tres replicones (Galibert *et al.*, 2001). El elemento de mayor tamaño es el cromosoma de 3.65 Mb (Capela *et al.*, 2001), y los otros dos elementos son conocidos como los megaplásmidos pSymA y pSymB, de 1.354 Mb y 1.68 Mb, respectivamente (Barnett *et al.*, 2001; Finan *et al.*, 2001).

- a) En el cromosoma se encuentran casi todos los genes constitutivos esenciales para el crecimiento y viabilidad celular, genes *housekeeping* como los encargados del metabolismo de ácidos nucleicos y proteínas, así como todos los genes implicados en las rutas de biosíntesis universales. Adicionalmente, en este replicón se puede encontrar la información genética necesaria para procesos de movilidad, quimiotaxis y de respuesta a estrés (Capela *et al.*, 2001).
- b) El pSymA es el replicón más pequeño de todos, en él se encuentran la mayoría de los genes implicados en nodulación (*nod*) y fijación de N (*nif*, *fix*) (Barnett *et al.*, 2001).
- c) En el megaplásmido pSymB se encuentran gran cantidad de genes implicados en sistema de captura de nutrientes y de síntesis de exopolisacáridos (aunque la mayoría de los reguladores transcripcionales de su síntesis se encuentran en el cromosoma). Estudios evolutivos ponen de manifiesto que este replicón fue integrado por el ancestro de *S. meliloti* antes que el pSymA (Finan *et al.*, 2001).

*S. meliloti* es una bacteria flagelada y móvil, pero con grandes diferencias con respecto al paradigma de enterobacterias, principalmente en la estructura del filamento y en la modulación de la rotación del flagelo (Schmitt, 2002).

La visualización al microscopio electrónico del filamento flagelar de *S. meliloti* ha permitido comprobar que se trata de filamentos complejos que difieren de los sencillos de *E. coli* y *Salmonella* spp. Los segundos son filamentos flexibles que poseen una estructura lisa con leves estrías en su superficie y que pueden girar tanto en el sentido de las agujas del reloj como al contrario, mientras que los de *S. meliloti* exhiben un prominente patrón helicoidal en superficie que alterna crestas y surcos, son rígidos y giran únicamente en el sentido de las agujas del reloj. La flexibilidad de los flagelos de enterobacterias les permite responder a los estímulos quimiotácticos cambiando su sentido de rotación. En el caso de las células de *S. meliloti*, al no poder cambiar el sentido de giro, es el control de la velocidad de rotación flagelar lo que les permite orientar el movimiento. En *E. coli*, los filamentos del flagelo están compuestos por

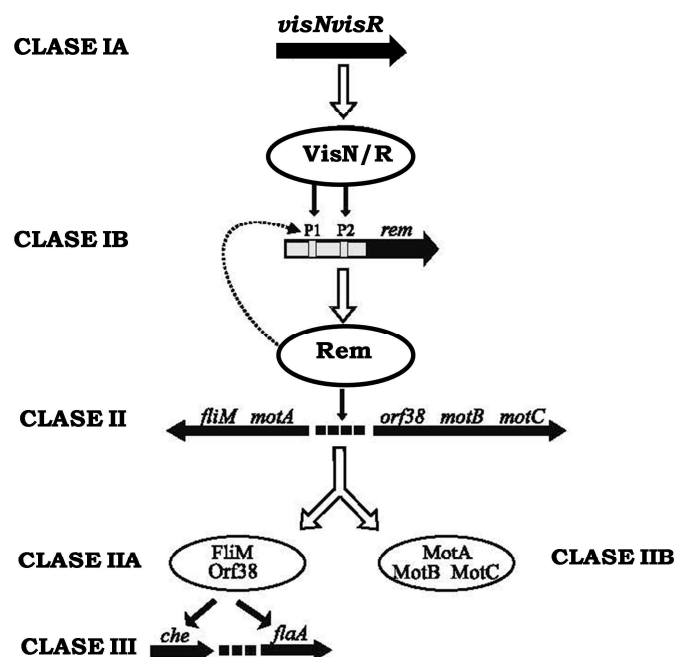
monómeros de un solo tipo de flagelina mientras que en *S. meliloti*, los filamentos flagelares son complejos y están formados por la unión de cuatro subunidades de flagelina formando heterodímeros. Las subunidades de flagelina (FlaA, FlaB, FlaC y FlaD) se encuentran estrechamente relacionadas y están codificadas por 4 genes ligados que se transcriben de manera independiente. FlaA es la principal flagelina, las otras tres constituyen las denominadas flagelinas secundarias. Para el ensamblaje de un filamento flagelar funcional es indispensable la presencia de FlaA y al menos una de las proteínas Fla secundarias (Scharf *et al.*, 2001; Schmitt, 2002).

En lo que al procesamiento de las señales quimiotácticas se refiere, continúan las diferencias entre *E. coli* y *S. meliloti*. Los receptores transmembrana capaces de detectar cambios en la concentración de atrayente/repelente son proteínas quimiotácticasceptoras de grupos metilo denominadas MCPs que regulan la actividad de la histidín quinasa, CheA. En *E. coli*, hasta el momento, se han descrito cuatro proteínas de este tipo, por el contrario, en *S. meliloti* el número de genes que codifican proteínas de este tipo asciende a nueve, de los cuales, *mcpS*, no se expresa cuando las células son móviles, mientras que la más abundante de todas ellas (McpU), por ejemplo, detecta prolina (Webb *et al.*, 2014). En enterobacterias, al igual que en *S. meliloti*, el incremento de repelente (o disminución de atrayente) se traduce en una autofosforilación de CheA dependiente de ATP y a continuación transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta. En *E. coli* el regulador de respuesta es la proteína CheY, que, una vez fosforilada (P-CheY), interactúa directamente con el motor flagelar y cambia el sentido de giro. Además, la proteína CheZ, con actividad fosfatasa, es la encargada de acelerar la defosforilación de CheY y modular su actividad. En *S. meliloti* no existe CheZ, pero sí dos reguladores de respuesta (CheY1 y CheY2), ambos pueden ser fosforilados por CheA-P. Por un lado, CheY2 (ortólogo a CheY), es el regulador de respuesta que interacciona con el motor flagelar e incrementa o disminuye su velocidad de rotación. De forma adicional, CheY2 es capaz de llevar a cabo una retrofosforilación vía CheA y acelerar así su desactivación. En cambio, CheY1 actúa como sumidero de grupos fosfato procedentes de CheA y suple la función de CheZ en enterobacterias (Schmitt, 2002).

Otra diferencia entre *E. coli* y *S. meliloti* radica en el regulador maestro y la organización en clases de algunos de los operones del regulón flagelar. Así,

mientras en *E. coli* el regulador maestro está codificado por el operón *flhDC*, en *S. meliloti* es un heterómero (heterodímero o heterotetrámero) constituido por dos reguladores transcripcionales de tipo LuxR codificados por el operón *visNvisR*. En *S. meliloti*, la mayoría de genes implicados en movilidad están organizados en una región contigua al cromosoma de 56 Kb. Al igual que en enterobacterias, en *S. meliloti* la regulación transcripcional de estos genes ocurre de manera jerárquica y se han organizado en tres clases principales, pero en el segundo caso la clase I se subdivide en IA y IB (figura 11).

La clase IA consta de los genes reguladores máster *visN* y *visR* que codifican el activador transcripcional VisNR; la clase IB situada en la cascada por debajo de la clase IA pero por encima de la clase II, incluye el gen *rem* (*regulator of exponential growth motility*), que codifica un activador transcripcional de los genes de la clase II responsable de limitar la expresión de estos genes a la fase exponencial de crecimiento; otra diferencia con el paradigma de enterobacterias es la subdivisión de la clase II en las clases IIA (*orf38* y *fliM*) y IIB (*motA* y *motBC*) dependiendo de si controlan la expresión de genes de la clase III (*fla* y *che*) o no (figura 11) (Rotter *et al.*, 2006; Sourjik *et al.*, 2000).



**Figura 11.** Esquema de la cascada de expresión del regulón flagelar en *S. meliloti*. Los operones están indicados como flechas horizontales y los correspondientes productos génicos como elipses. Los controles de transcripción positivos se anotan como flechas negras verticales y los correspondientes productos génicos como flechas abiertas. Se muestran los promotores de la transcripción de *rem* (P1 y P2), y dos activadores, VisN/R y Rem (flecha punteada) (Rotter 2006).

En *S. meliloti*, al igual que en otras bacterias, la expresión de los genes flagelares parece estar sujeta a un estricto control. Así lo han puesto de

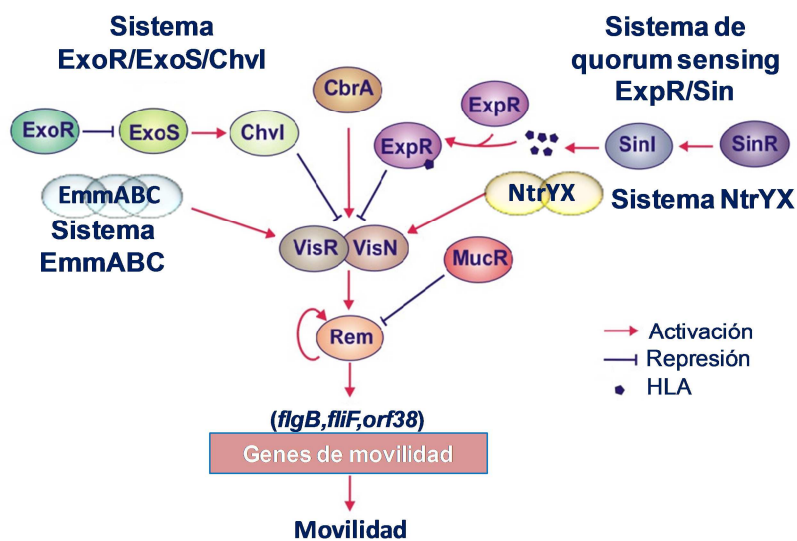
manifiesto varios análisis de expresión génica global llevados a cabo en *S. meliloti*, donde se ha visto que la respuesta a cambios ambientales como por ejemplo: estrés osmótico, pH ácido y hambre de hierro y fosfato, dan lugar a una rápida represión de los genes flagelares y de movilidad (Domínguez-Ferreras et al., 2006; Hellweg et al., 2009; Krol and Becker, 2004).

Todos estos datos ponen de manifiesto la existencia de una respuesta quimiotáctica muy compleja en *S. meliloti* que es típica de bacterias que han de adaptarse a entornos cambiantes.

Por otro lado, en esta misma bacteria existe co-regulación inversa entre movilidad y la producción de EPSs en la que participan diversos sistemas reguladores. Uno de ellos es el sistema de regulación QS ExpR/Sin. En *S. meliloti*, la baja densidad celular induce la expresión de los genes de movilidad a través del regulador transcripcional ExpR. En la situación opuesta, al incrementar la densidad poblacional, la actuación conjunta de ExpR y de las AHLs (producidas por la AHL sintasa SinI), inhibe la transcripción del operón *visNR*, provocando la reducción en la expresión de los genes que pertenecen al regulón flagelar (Hoang *et al.*, 2008)

No solo el sistema QS ExpR/Sin regula la expresión de los genes de movilidad, se ha visto que el sistema regulador de dos componentes ExoS/ChvI (implicado en la regulación de la síntesis de EPS I), también reprime la expresión de los genes de movilidad a través de *VisNR* y *Rem* (Belanger *et al.*, 2009; Hoang *et al.*, 2008). Distintos mutantes en este sistema súperproducen EPS I y además son aflagelados. Gibson y colaboradores (2007), vieron que un transposante afectado en *CbrA*, una putativa histidín-quinasa con un dominio sensor PAS requerida para el establecimiento de simbiosis efectivas, superproduce EPS I y algunos genes de movilidad se encuentran reprimidos, entre ellos *visNR*, *rem*, *fla* y de quimiotaxis, como demuestra el estudio de expresión génica global llevado a cabo en dicho mutante. Posteriormente se ha comprobado que también se encuentra seriamente afectado en movilidad *swimming*. La proteína reguladora *MucR*, la cual juega un papel esencial en la producción de EPS, reprime la expresión de *rem* (Bahlawane *et al.*, 2008). Finalmente, cualquier mutación que afecte al sistema EmmABC formado por la proteína reguladora *EmmA* y el sistema de dos componentes *EmmBC*, da lugar a mutantes no móviles que muestran incrementada la síntesis de EPS y que son incapaces de establecer simbiosis efectiva con alfalfa (Morris and

González, 2009). Recientemente se ha descrito en *S. meliloti* un nuevo sistema regulador de dos componentes NtrY/NtrX implicado en la biosíntesis de succinoglicano, movilidad y simbiosis. En este sistema, el regulador de respuesta NtrX regula de forma negativa la biosíntesis de succinoglicano mientras que actúa positivamente sobre *visN/visR* e incrementa la expresión de la flagelina y genes reguladores que controlan la formación del flagelo. Mutantes *ntrX* se encuentran seriamente afectados en el establecimiento de simbiosis efectivas (Wang *et al.*, 2013).



**Figura 12.** Regulación de los genes de movilidad en *S. meliloti* a través de MucR. CbrA y los cuatro sistemas reguladores conocidos hasta el momento: ExoR/ExoS/ChvI, ExpR/SinR/SinI, EmmABC y NtrXY. Modificado de Janczarek M., (2011).

## 6. Swarming en *Rhizobium*.

El *swarming* es un movimiento poco estudiado en bacterias no patógenas. Soto y colaboradores (2002) fueron pioneros en la identificación de este tipo de movilidad en *Rhizobium*, describiéndolo por primera vez en *S. meliloti*. Posteriormente ha sido también observado en *R. etli*, *R. leguminosarum* y *Bradyrhizobium japonicum* (Braeken *et al.*, 2008; Covelli *et al.*, 2013; Soto *et al.*, 2002; Tambalo *et al.*, 2010).

Estudios llevados a cabo en una cepa silvestre de *R. etli* pusieron de manifiesto la existencia de *swarming* en este rizobio (Daniels *et al.*, 2004). Los mismos autores observaron que mutaciones en el sistema de QS *cinIR* de esta bacteria impiden la puesta en marcha de esta movilidad en superficie y demostraron que las AHLs de *R. etli*, las cuales se caracterizan por presentar un ácido graso de cadena larga, además de actuar como señal de QS, actúan



como biosurfactantes facilitando la translocación bacteriana sobre la superficie (Daniels *et al.*, 2006).

Posteriormente, con el objetivo de identificar determinantes genéticos del *swarming* en *R. etli*, Braeken y colaboradores (2008), llevaron a cabo una mutagénesis al azar con el minitransposón Tn5. El análisis de las secuencias de los transposantes afectados en este tipo de translocación permitió conocer que no sólo mutaciones en genes relacionados con movilidad, quimiotaxis o flagelos dan lugar a defectos en *swarming*, sino que genes relacionados con QS, composición y transporte de polisacáridos, y metabolismo de aminoácidos y poliaminas, también tienen un importante papel en dicha movilidad. Además, en algunos de estos mutantes también se vio afectada la capacidad de nodulación y la fijación de nitrógeno.

El *swarming* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* ha sido descrito en las cepas 3841 y VF39SM. Ésta última mostró una mayor eficiencia de movilidad *swarming* que la cepa 3841, ya que, además de iniciar el desplazamiento en superficie antes, fue capaz de colonizar casi en su totalidad la superficie de agar de la placa de Petri. Del borde de la colonia *swarmer* de VF39SM se obtuvieron células hiperflageladas, mientras que en el centro de la colonia se detectaron células similares a las observadas en estado vegetativo. Adicionalmente se vio que para que el *swarming* de este rizobio tenga lugar, son parámetros cruciales la densidad celular, la fuente de carbono y la temperatura de incubación. Los autores defienden que en la capa de matriz extracelular que rodea la colonia *swarmer* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* no se detectó la presencia de moléculas surfactantes y que las células *swarmer* de ambas cepas de *R. leguminosarum* bv. *viciae* presentan una mayor resistencia a antibióticos (Tambalo *et al.*, 2010).

Estudios recientes llevados a cabo en dos cepas de *B. japonicum* (LP 3004 y LP 3008), han puesto de manifiesto su capacidad para moverse en superficies con una concentración de 0.5% de agar de manera dependiente de flagelos, ya que mutantes afectados en estos pierden totalmente la capacidad de movilidad en las mismas condiciones de ensayo. Se ha visto que las colonias ramificadas resultantes de esta translocación están integradas por bacterias elongadas e hiperflageladas asociadas en grupos. Además, la hiperflagelación que sufren estas células se debe al incremento de flagelos laterales, cuya síntesis se encuentra profundamente influenciada por la fuente de carbono, todas estas

características permiten definir este tipo de movilidad como *swarming* (Covelli *et al.*, 2013).

En *S. meliloti* se identificó por primera vez *swarming* en el mutante QS77 derivado de la cepa GR4. Este mutante que se encuentra afectado en el gen *fadD* que codifica una acil-CoA sintetasa específica de ácidos grasos de cadena larga, mostraba *swarming* y defectos de nodulación. La colonia de QS77 se mueve extendiéndose sobre la superficie del medio mostrando un patrón dendrítico. Durante la observación al microscopio de las células *swarmer* se vio que éstas son casi el doble de largas que las de la cepa silvestre e hiperflageladas, presentando aproximadamente seis veces mayor número de flagelos. En esta bacteria, el *swarming* se ve influenciado por la concentración y tipo de agar, densidad poblacional, viscosidad del medio de crecimiento y por la fuente de nitrógeno y carbono. QS77, además, muestra alteraciones en expresión génica, ya que sobreexpresa genes flagelares (*flaA*) en respuesta al crecimiento en condiciones inductoras de *swarming* y presenta reducción en la transcripción del gen simbiótico *nodC* en distintas condiciones de crecimiento. A pesar de que el mutante *fadD* es capaz de inducir nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de alfalfa, es menos infectivo y competitivo que la cepa silvestre. Estos resultados llevaron a sugerir que compuestos de naturaleza lipídica relacionados con la actividad FadD podrían actuar como señales capaces de controlar *swarming* y la capacidad simbiótica de la bacteria.

Investigaciones realizadas en el grupo de la Dra. Soto revelan que el control del *swarming* en *S. meliloti* es diferente entre distintas cepas silvestres. Así, mientras la cepa GR4 nunca ha mostrado *swarming* en medio mínimo semisólido, las cepas Rm1021 y Rm2011 sí lo hacen con cierta frecuencia en las mismas condiciones, aunque en todas la ausencia de *fadD* promueve la migración multicelular (Nogales *et al.*, 2010). El reciente análisis del transcriptoma de un mutante *fadD* de *S. meliloti* en condiciones inductoras de *swarming* (medio mínimo semisólido), ha revelado que cuando crecen en una superficie, las células de *S. meliloti* sufren notables cambios en su fisiología con respecto a células que crecen en medio líquido. Dicho cambio queda reflejado en la expresión diferencial de más de mil genes implicados en distintas actividades metabólicas, captación y metabolismo de hierro, movilidad, quimiotaxis y genes de respuesta a estrés. El crecimiento de un mutante *fadD* en condiciones inductoras de *swarming* provoca la inducción

específica de genes relacionados con la captación y metabolismo del hierro. En ese mismo estudio se demostró que los niveles de hierro presentes en el medio, y genes esenciales para la biosíntesis del sideróforo rhizobactina 1021 (*rhrA* y *rhb*) desempeñan un papel clave en el control del *swarming* en una cepa silvestre de *S. meliloti*, pero no en un mutante *fadD*. La presencia de altas concentraciones de hierro en el medio inhibe la movilidad *swarming* de la cepa silvestre Rm1021, pero no la de un mutante en el regulador global de respuesta a hierro RirA ni la del mutante *fadD*. Un mutante *rirA* no sólo continúa moviéndose en medios con alta concentración de hierro, sino que parece desarrollar mayor movilidad en superficie, lo que sugiere la implicación de este regulador en el control de los genes relacionados con el *swarming* en respuesta a la concentración de hierro (Nogales *et al.*, 2010).

Estudios llevados a cabo por Bahlawane y colaboradores (2008) concluían la necesidad de un sistema de quorum sensing ExpR/Sin funcional para que la cepa Rm2011 de *S. meliloti* pudiera desarrollar *swarming*. Sin embargo, estudios llevados a cabo por el grupo de la Dra. Soto demostraban la capacidad de desarrollar este tipo de movilidad en las cepas sabidas *ExpR*, Rm1021 y Rm2011. Estos datos contradictorios llevaron a la necesidad de reevaluar el papel del regulador tipo LuxR, ExpR, en la movilidad en superficie de estas cepas. Como resultado de sus investigaciones, han demostrado que la cepa Rm1021 es capaz de desplazarse en una superficie utilizando al menos dos tipos de movilidad: un movimiento independiente de la acción flagelar que es promovido por la producción de altos niveles de exopolisacáridos (EPS I y EPS II), y movilidad *swarming*, absolutamente dependiente de flagelos pero que no requiere ExpR, por lo que este regulador transcripcional perteneciente al sistema QS de *S. meliloti*, aunque promueve movilidad en superficie a través de la producción de EPS II, no es esencial para la movilidad *swarming* (Nogales *et al.*, 2012).

Gao y colaboradores (2012) han sido descrito y caracterizado un tipo de movimiento en superficie catalogado como *swarming* por su dependencia flagelar en Rm8530 (cepa *expR+* de *S. meliloti*). Se trata de un movimiento coordinado que se pone de manifiesto en la superficie de medio LB diluido y con bajo porcentaje de agar (0.4%), y que es estimulado sólo por determinadas AHLs (C16:1 y 3-oxo- C16:1 HL) de manera dependiente de ExpR.

Estudios recientes llevados a cabo en *R. leguminosarum* bv. *viciae* han puesto de manifiesto los efectos que sobre el *swarming* de esta bacteria tienen exudados radicales de hospedadores específicos e inespecíficos. Por un lado, los exudados de semillas de lentejas y extractos de musgo estimularon esta movilidad. Sin embargo, el contacto con exudados de semillas de guisante no ejercieron efecto alguno sobre el desarrollo del *swarming*, mientras que los exudados de semillas de haba lo inhibían. El incremento en la expresión del gen *flaA* en células *swarmer* que han estado en contacto con los exudados estimuladores, parece ser la causa de esta mayor movilidad. Por otro lado, el contacto con exudados procedentes de un mutante de musgo (*Ppccd8Δ*) deficiente en la síntesis de la fitohormona estrigolactona, descrita como una molécula señal implicada en el establecimiento de simbiosis efectiva entre la micorriza arbuscular y la planta hospedadora, no dio lugar al efecto estimulador sobre el *swarming* previamente observado. Estos datos además de demostrar una interacción positiva entre hospedadores no específicos y los rizobios, sugieren la existencia de una antigua señalización potencial entre *Rhizobium* y los ancestros de las plantas vasculares, previa a la interacción específica entre rizobios y leguminosas (Tambalo *et al.*, 2014).

Cuál es la función del *swarming* en *Rhizobium* sigue siendo una incógnita. No obstante, el hecho de que mutaciones que afectan a esta movilidad en *S. meliloti* y *R. etli* produzcan alteraciones en el fenotipo simbiótico, sugiere que los componentes necesarios durante el *swarming* y/o factores que se co-expresan durante la diferenciación a célula *swarmer*, podrían tener un papel importante en la interacción con la planta.

## **7. Movilidad y quimiotaxis en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.**

Mediante la quimiotaxis, las bacterias pueden detectar los cambios en la composición química del entorno (incremento o disminución de sustancias atrayentes o/repelentes) y llevar a cabo un movimiento consecuente con la información recogida del ambiente exterior. Las señales químicas son percibidas y transmitidas al motor flagelar a través de una cascada de señalización, que finaliza bien con un cambio en la velocidad (*S. meliloti*) o en el sentido (*E. coli*) de rotación flagelar (Wadhams and Armitage, 2004) lo que

permite dirigir el movimiento bacteriano de forma adecuada para garantizar la supervivencia de la célula. En bacterias móviles, como *Rhizobium*, la actuación coordinada entre quimiotaxis y movilidad permite una rápida actuación frente a determinadas señales. Por ejemplo, la detección de estímulos como la presencia de sustancias tóxicas o escasez de nutrientes puede generar un movimiento de huida que continúa hasta que las condiciones ambientales revierten.

Tradicionalmente se piensa que mediante la quimiotaxis las bacterias orientan su movimiento hacia los compuestos quimioatrayentes (exudados) de las raíces de las leguminosas, favoreciendo el establecimiento de la simbiosis, ya que dirige a la bacteria hacia el sitio adecuado para iniciar el proceso de infección. Se cree que la movilidad en *Rhizobium* es crítica para el establecimiento de la simbiosis en condiciones naturales por permitir a la bacteria un mejor acceso a los nutrientes y una mejor colonización del hospedador (Gao *et al.*, 2012). De acuerdo con esta hipótesis, se ha comprobado en ensayos *in vitro* que varias especies de *Rhizobium*, entre las que se encuentra *Rhizobium leguminosarum* y *S. meliloti*, muestran un movimiento orientado hacia estos exudados (Caetano-Anolles *et al.*, 1988; Dharmatilake and Bauer, 1992). Estudios clásicos realizados con cepas mutantes de *Rhizobium* no quimiotácticas o no móviles, pero no caracterizadas genéticamente, mostraban que estas cepas eran menos competitivas y menos eficientes en la nodulación que las cepas silvestres, sugiriendo que si bien movilidad y quimiotaxis no eran esenciales para la nodulación y fijación de nitrógeno, sí que parecían contribuir a las etapas iniciales de la interacción bacteria-planta (Ames and Bergman, 1981; Caetano-Anolles *et al.*, 1988; Soby and Bergman, 1983). Sin embargo, son escasos los estudios realizados con cepas mutantes genéticamente bien definidas que permitan conocer exactamente la contribución de quimiotaxis y motilidad en el establecimiento de la simbiosis Rhizobium-leguminosa.

En *R. leguminosarum* bv. *viciae* dos proteínas de quimiotaxisceptoras de grupos metilo (MCP) y el cluster de quimiotaxis *che1*, son importantes en la eficiencia de nodulación de plantas de guisante y en la capacidad competitiva de la bacteria, ya que si bien los mutantes estudiados conservan su capacidad para moverse, son incapaces de reorientar su movimiento adecuadamente (Miller *et al.*, 2007; Yost *et al.*, 2004). En *S. meliloti*, se ha visto que mutantes en los genes *fliP* y *fliG* (aflagelados) son capaces de nodular, aunque sí

muestran un retraso en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Fujishige *et al.*, 2006c).

Una vez establecida la bacteria en los nódulos, en general se admite que la movilidad ya no es necesaria para el desarrollo de los bacteroides o durante el proceso de fijación de nitrógeno. Este hecho se ha puesto de manifiesto en un análisis transcriptómico llevado a cabo en células de *S. meliloti* y *R. leguminosarum* aisladas de nódulos maduros y de células en vida libre, donde se vio una menor expresión de genes flagelares y de quimiotaxis en los primeros. (Becker *et al.*, 2004; Yost *et al.*, 2004).

En *S. meliloti*, Gurich y González (2009) demostraron que la represión de genes de movilidad mediada por el sistema de QS ExpR/Sin es esencial para que se pueda llevar a cabo una invasión efectiva de los nódulos. Así, estos autores encontraron que un mutante *sinI* induce menor número de nódulos rosados fijadores de nitrógeno que la cepa silvestre, un mutante *expR* o un doble mutante *expRsinI*. La incapacidad de este mutante para reprimir la síntesis de flagelos parece ser la causa de su defecto simbiótico, ya que un mutante *sinI* aflagelado, recuperaba completamente la capacidad de establecer una simbiosis efectiva. Varias son las explicaciones que se pueden dar acerca de cómo los flagelos interfieren con el desarrollo de la interacción simbiótica: puede que éstos interfieran con el movimiento de las bacterias en el interior de los canales de infección y/o que desencadenen una respuesta de defensa en la planta (Gurich and Gonzalez, 2009).

## **8. Formación de biopelículas en *Rhizobium*.**

Aunque las investigaciones sobre biopelículas se han enfocado sobre todo hacia patógenos de humanos y animales, se ha constatado que los rizobios son capaces de formar biopelículas, aunque se conoce muy poco sobre componentes esenciales para su desarrollo y sus mecanismos reguladores, y aún no está claro qué papel desempeña este proceso en el establecimiento de asociaciones con plantas.

Fujishige y colaboradores (2006) fueron pioneros en poner de manifiesto la capacidad de formar biopelículas de *S. meliloti* tanto en superficies abióticas como *in planta*. A pesar de que esta bacteria es pésima formadora de biopelículas en superficies inertes, mediante el uso de placas de

microtitulación, se ha visto que las condiciones nutricionales limitantes favorecen la transición desde un modo de vida planctónico a una forma de vida sésil. Así, nutrientes como la sacarosa, el fosfato y el calcio estimulan la formación de biopelículas sobre superficies abióticas, mientras que condiciones subóptimas de temperatura o pH y estreses osmóticos, la afectan negativamente (Rinaudi and Giordano, 2010).

Diversos datos indican que los rizobios utilizan componentes celulares (flagelos y EPSs) y mecanismos reguladores (QS) comunes con otras bacterias durante la formación y desarrollo de las biopelículas. En general, mutantes defectivos en la producción de EPSs presentan menor capacidad de formar biopelículas, mientras que en aquellos cuya síntesis está incrementada muestran una mayor capacidad de adherencia y formación de biopelículas que, a pesar de ser más gruesas, son menos estables que las de la cepa parental (Fujishige et al., 2006d; Rinaudi and Giordano, 2010; Rinaudi and Gonzalez, 2009; Wells et al., 2007). En este sentido, mutantes ExoY de *S. meliloti* defectivos en la síntesis de EPS I, exopolisacárido responsable de la adecuada invasión bacteriana, no desarrolla biopelículas maduras. Por otro lado, la producción de la fracción de bajo peso molecular de EPS II o galactoglucano (otro EPS simbióticamente importante), cuya síntesis requiere un sistema de QS EpxR/SinI funcional, permite a *S. meliloti* el desarrollo de biopelículas altamente estructuradas en la superficie de los pelos radicales del hospedador. Mutantes *exoR95* y *exoS96*, súperproductores de EPS I, resultaron significativamente mejores formadores de biopelículas en superficies de plástico que la cepa de referencia, aunque dicha biopelícula se desprendía fácilmente del pocillo tras el lavado (Fujishige et al., 2006b). Sin embargo, la mejor capacidad para formar biopelículas de esos mutantes, no puede atribuirse únicamente al incremento de EPS I, ya que también carecen de flagelos, que constituyen otro elemento estructural de vital importancia para el desarrollo de estas. En otros rizobios como *R. leguminosarum* o *B. japonicum* también se ha podido comprobar el papel relevante que los EPSs tienen en la formación de estas estructuras (Russo et al., 2006; Wang et al., 2008). De manera general se cree que, al igual que para otras bacterias, en *Rhizobium* los EPSs son importantes para estabilizar la estructura tridimensional de la biopelícula por servir como andamios de otras moléculas que mantienen la biopelícula unida.

El papel de los flagelos, o de la movilidad en general, para el inicio y desarrollo de estas estructuras por parte de rizobios aún no ha sido profundamente investigado. El grupo de la Dra. A. Hirsch (Univ. de California-Los Angeles, USA) fue el primero en demostrar que *S. meliloti* es capaz de desarrollar biopelículas tanto en sustratos inertes como raíces. Sus investigaciones han puesto de manifiesto que la capacidad de formación de biopelículas de mutantes aflagelados (*fliP* y *flgH*) de este rizobio en placas de PVC se ve disminuida. En condiciones axénicas estos mutantes, aunque son capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno, muestran un retraso en la formación de nódulos (Fujishige *et al.*, 2006c). Por todo esto proponen que los flagelos facilitan la unión reversible de *Rhizobium* a la raíz; sin embargo, aún no está claro si el defecto simbiótico causado por la ausencia de flagelos se debe a la incapacidad de movimiento, a los defectos en la formación de biopelículas, o a ambos. Por otro lado, se sabe que en *Rhizobium* las señales de QS están relacionadas, entre otros procesos, con la formación de biopelículas. En *R. etli* se ha visto que las señales de QS participan en la dispersión de biopelículas ya formadas (Daniels *et al.*, 2004). El sistema de QS ExpR/Sin, a través de la producción de EPS II (y en concreto a través de su fracción de bajo peso molecular), controla la formación de biopelículas en cepas de *S. meliloti* con un *expR* funcional (Rinaudi and Gonzalez, 2009). A pesar de que se asume que EPS II proporciona la matriz adecuada para el desarrollo de biopelículas altamente organizadas, en *R. leguminosarum*, se ha visto que la interrupción del sistema de QS CinIR o de *expR* lleva asociado un incremento en la formación de biopelículas (Edwards *et al.*, 2009).

Además de QS, flagelos/movilidad y EPSs, algunos factores específicos de *Rhizobium* participan en la formación de biopelículas. Se ha visto que mutantes delecionados en el plásmido pSym de *R. leguminosarum* bv. viciae son peores formadores de biopelículas, sugiriendo que factores codificados en este plásmido son necesarios en el establecimiento de biopelículas de esta bacteria (Fujishige *et al.*, 2006a). Adicionalmente, también se ha visto que los genes *nod* y sus productos (los FN) en *Rhizobium* no son únicamente esenciales en el proceso de simbiosis, sino que su papel va más allá y también son necesarios para el establecimiento de biopelículas maduras. Se ha observado que mutantes en los genes *nod* son incapaces de formar biopelículas tridimensionales tanto en superficies bióticas como inertes. Esto



ha llevado a proponer que además de su función como morfógenos, el esqueleto del FN funciona como una adhesina que mantiene las células de *Rhizobium* unidas confiriendo a la bacteria mayor resistencia a la desecación y/o a las respuestas defensivas de la planta. Fujishige et al. (2008).

*Rhizobium* es capaz de adherirse a las raíces de plantas leguminosas y no leguminosas, esta habilidad permite aumentar el número de rizobios en la rizosfera y una mayor probabilidad de infección de la planta garantizando el éxito en el establecimiento de la simbiosis (Danhorn and Fuqua., 2007; Rodriguez-Navarro et al., 2007). A pesar de que la adhesión es una etapa que parece ser esencial para la simbiosis, aún no se ha descrito ningún mutante de *Rhizobium* completamente afectado en dicha habilidad, aunque sí se ha visto que mutantes con dificultades de adhesión (formación de biopelículas) muestran una reducción en su capacidad de formación de nódulos (Hirsch, 2009). Se cree que el proceso de adhesión de estas bacterias a la raíz ocurre en dos etapas; la primera es descrita como una etapa de acoplamiento de las células a la superficie *docking* o unión no específica, en la que las células se adhieren débilmente y de manera reversible por medio de las lectinas y las ricadhesinas de la planta y los flagelos de la bacteria. Con posterioridad a esta débil adhesión se produce la segunda etapa conocida como *locking*, que consiste en una unión fuerte e irreversible de las bacterias a la raíz favorecido por los polisacáridos de superficie, fibrillas de celulosa, pili y otras proteínas (Hirsch, 2009; Robledo et al., 2008; Rodriguez-Navarro et al., 2007). En la adhesión firme de las bacterias a los pelos radicales y anclaje de estas a la superficie de la raíz o *locking*, median los polisacáridos bacterianos de superficie tales como EPSs, lipopolisacáridos (LPSs), polisacáridos capsulares (KPSs) y  $\beta$ -1-2 glucanos, junto con las fibrillas de celulosa, pili e incluso FN. En cuanto a los LPSs, se ha visto que en *S. meliloti* mutaciones en *lpsB* o en *bacA*, que afectan a la biosíntesis del esqueleto de los LPSs y a la distribución de los ácidos grasos que forman parte del lípido A respectivamente, llevan asociada una menor capacidad en la formación de biopelículas en placas de PVC (Fujishige, 2006).

Con respecto a los  $\beta$ -1,2-glucanos, en *S. meliloti* se ha visto que mutaciones en los genes *ndvA* o *ndvB* (implicados en su síntesis y transporte respectivamente), reducen la adhesión de las células bacterianas a la raíz de la planta. Adicionalmente, el mutante *ndvB* es mucho menos eficiente en la

formación de biopelículas en plástico que la cepa parental (Fujishige, 2006). Es importante mencionar que además de su importancia en la etapa de adhesión, se ha visto que los EPSs, LPS, KPS y  $\beta$ -1-2-glucanos son requeridos en etapas posteriores de la simbiosis, atribuyéndoles varias posibles funciones: i) actuar como molécula señal induciendo procesos específicos de la simbiosis o bloqueando respuestas defensivas de la planta, ii) actuar a modo de barrera que protege a la bacteria de mecanismos de defensa del vegetal, o iii) permitir la adaptación de la bacteria a los distintos ambientes con los que se encontrará a lo largo del proceso infeccioso (Soto *et al.*, 2009; Soto *et al.*, 2006). Aunque es poco lo que se conoce de la producción y de su papel en la simbiosis, la celulosa es otro importante polisacárido en la formación de biopelículas por *Rhizobium* o microorganismos muy relacionados. En el caso de algunas de las especies para las que se ha descrito la producción de ésta, se ha propuesto que dicho polisacárido es requerido para lograr una infección óptima de los pelos radicales largos y para la formación de agregados o “caps” a pH 6.5 y 7.5 tras la adhesión inicial de la bacteria a los pelos radicales (Mateos, 1995; Smit *et al.*, 1992). Estudios recientes llevados a cabo con la endoglucanasa CelC2 de una cepa silvestre de *R. leguminosarum* bv. trifolii, han puesto de manifiesto que alteraciones en los niveles de esta endonucleasa llevan asociadas una reducción de la capacidad de formación de biopelículas tanto en superficies abióticas como *in planta*. Los autores de este estudio sugieren el papel modulador de CelC2 en la longitud de las fibrillas de celulosa que median la adhesión firme de las células de *Rhizobium* y que la celulosa es un componente esencial de la arquitectura de la matriz polisacáridica de la biopelícula (Robledo *et al.*, 2012).

## **9. Papel de la movilidad y formación de biopelículas en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.**

Recientes estudios llevados a cabo en el grupo de la Dra. Soto (Amaya-Gómez, 2013), indican que genes y factores medioambientales que afectan la movilidad *swarming* en *S. meliloti* también influyen en la capacidad de formar biopelículas. En este sentido se ha visto que, al igual que los flagelos, los genes esenciales en la biosíntesis del sideróforo rizobactina 1021 desempeñan un papel clave en el movimiento en superficie y el desarrollo de biopelículas maduras de la cepa Rm1021 de *S. meliloti*. La función de estos genes en los dos fenotipos asociados a superficie no está exclusivamente ligada al

mantenimiento de la homeostasis intracelular de hierro. Por otro lado, los niveles de hierro en el medio constituyen una señal medioambiental que controla la capacidad de movimiento en superficie y la capacidad de formar biopelículas de *S.meliloti*. Altas concentraciones de hierro inhiben específicamente la translocación en superficie de una cepa silvestre, al mismo tiempo que inducen la formación de biopelículas altamente estructuradas que se desarrollan más rápido que aquellas formadas en presencia de bajos niveles de hierro. Junto con el hierro, los genes *fadD* y *rirA* forman parte de los mecanismos que co-regulan de manera inversa movilidad en superficie y desarrollo de biopelículas en *S. meliloti*. Una mutación que provoque pérdida de función en cualquiera de estos genes induce translocación en superficie, incluso en condiciones desfavorables como es la presencia de altos niveles de hierro, e interfiere negativamente con el desarrollo normal de biopelículas. El control sobre la producción de rizobactina 1021 podría ser la causa final responsable del efecto del hierro y una mutación *rirA* en los dos fenotipos asociados a superficie.

La cepa GR4, incapaz de producir rizobactina 1021 y poco propensa a mostrar desplazamiento en superficie en condiciones de laboratorio, es mejor formadora de biopelículas que la cepa Rm1021 tanto en una superficie abiótica como el vidrio como sobre la superficie de raíces de alfalfa, pudiendo ser ésta al menos una de las razones del mejor comportamiento simbiótico de GR4.

El sideróforo rizobactina 1021 tiene propiedades surfactantes que podrían ser, al menos en parte, responsables de su función en translocación en superficie y formación de biopelículas en *S. meliloti*.

Por otro lado, el producto del gen *rhbG* (*sma2339*) no es esencial ni para la síntesis del sideróforo ni para el desplazamiento en superficie de *S. meliloti*. No obstante, la acción de este gen tiene efectos tanto en los niveles de sideróforo producidos por la bacteria, como en movilidad y en el desarrollo de biopelículas, y que la pérdida de función de *rhbG* promueve movimiento bacteriano independiente de la acción flagelar e interfiere negativamente con el desarrollo de biopelículas de modo casi idéntico por mutaciones en *rhbA* y *rhbD*.

Finalmente, el análisis de distintas propiedades simbióticas de mutantes afectados en movilidad en superficie y formación de biopelículas (*fadD*, *rhb*, *rhtA*, *rirA*) ha puesto de manifiesto que aunque estos mutantes son capaces de

desarrollar nódulos en plantas de alfalfa, la mayoría exhiben algún defecto simbiótico en mayor o menor grado, encontrándose los fenotipos más acusados en mutantes hipermóviles en superficie.

# **OBJETIVOS**



La simbiosis mutualista que establecen las bacterias del suelo conocidas genéricamente como *Rhizobium* y las plantas leguminosas constituye un excelente modelo para investigar mecanismos moleculares que rigen las interacciones planta-bacteria. En la actualidad, se conoce con bastante detalle cómo la bacteria es capaz de inducir la organogénesis del nódulo en la raíz de su planta hospedadora, así como los determinantes implicados en la regulación y fijación del dinitrógeno molecular. El interés de los investigadores en estos dos procesos que sin duda alguna constituyen los rasgos distintivos y de gran relevancia agronómica y ecológica de esta asociación planta-bacteria, es en parte responsable de que el conocimiento existente sobre las primeras etapas de la interacción como la adsorción y colonización de la superficie de la raíz, así como los eventos previos de quimiotaxis y movilidad, sea escaso. *Sinorhizobium meliloti*, simbiote de alfalfa, constituye un modelo dentro de la clase de las alfa proteobacteria para el estudio de distintos aspectos de la movilidad bacteriana que difieren notablemente del paradigma de enterobacterias. A pesar de ello, aún es escaso el conocimiento sobre mecanismos de regulación génica asociados al regulón flagelar o qué tipos de translocación en superficie (*swarming*, *twitching* o *sliding*) puede presentar esta bacteria y cómo controla su aparición. Más escasa es aún, la información disponible sobre el papel que los distintos tipos de movilidad de *S. meliloti* pueden desempeñar en la interacción con la planta. Investigaciones previas en el grupo en el que se ha realizado este trabajo de Tesis Doctoral han puesto de manifiesto la movilidad *swarming* asociada a un mutante *fadD* de *S. meliloti*, una posible conexión en el control de *swarming* y formación de biopelículas, así como la importancia de componentes esenciales en el *swarming* y/o co-regulados durante este proceso, en la infectividad y competitividad de la bacteria por la nodulación de alfalfa.

El **Objetivo General** de este trabajo ha sido profundizar en las bases moleculares, determinantes genéticos y señales, que gobiernan la movilidad en superficie de la bacteria modelo *S. meliloti*, investigando además su posible conexión con formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis con alfalfa. Para ello se han abordado los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación de determinantes genéticos implicados en la movilidad en superficie mostrada por mutantes *fadD* de *S. meliloti* GR4 y Rm1021.

2. Caracterización funcional de *cheA*, *exoX* y *smc00525* en distintos fondos genéticos de *S. meliloti*: Participación en movilidad en superficie, formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis con alfalfa.
3. Caracterizar la movilidad mostrada por las cepas GR4 y Rm1021 de *S. meliloti* en dos nuevas condiciones inductoras de movilidad en superficie: agar noble y 2-tridecanona (2-TDC), e identificar posibles mecanismos implicados.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Técnicas microbiológicas

### 1.1. Cepas y plásmidos utilizados

Las cepas de *S. meliloti* y *E. coli*, así como los plásmidos empleados en este trabajo, junto con sus características más relevantes se describen en las tablas 1 y 2.

**Tabla 1.** Cepas utilizadas en este trabajo

Bacteria	Características relevantes	Referencias
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44, ΔlacU169, f80, LacZΔM, 5hsdR171, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Bethesda Research Laboratory
S17-1	<i>thi, pro, recA, hsdR, hsdM, RP4-2-2Tc::Mu, Km::Tn7, Tp<sup>r</sup>, Sm<sup>r</sup></i>	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
Rm1021	Cepa silvestre, Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup> , SU47 <i>expR102::ISRm2011-1;Sm<sup>r</sup></i> .	(Meade and Signer, 1977)
GR4	Cepa silvestre, Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	(Casadesús and Olivares, 1979)
1021FDCSS	Rm1021( <i>fadD::SmSp</i> ); Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	(Amaya-Gómez., 2009)
GR4FDCSS	GR4( <i>fadD::SmSp</i> ); Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	(Amaya-Gómez., 2009)
NS26	1021FDCSS( <i>flgG::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
NS2.9	1021FDCSS( <i>flgI::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
NS302	1021FDCSS( <i>motC::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
NS320	1021FDCSS( <i>flgH::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
NS324	1021FDCSS( <i>cheA::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
NS33	1021FDCSS( <i>sodB::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
SPS1	1021FDCSS( <i>exoX::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
C61	1021FDCSS::Tn5. Transposante control no afectado en movilidad. Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GNS5	GR4FDCSS( <i>flgK::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GNS43	GR4FDCSS( <i>flgC::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GNS76	GR4FDCSS( <i>visN::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GNS53	GR4FDCSS( <i>visR::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GNS55	GR4FDCSS(Región intergénica <i>fliQ-flhA::Tn5</i> ) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo

GNS61	GR4FDCSS( <i>emmA</i> ::Tn5) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GNS76	GR4FDCSS( <i>visN</i> ::Tn5) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GSPS51	GR4FDCSS( <i>smc00525</i> ::Tn5) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GC60	GR4FDCSS::Tn5. Transposante control no afectado en movilidad. Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
1021Δ <i>visNR</i>	Rm1021(Δ <i>visNvisR</i> ), Sm <sup>r</sup>	B. Scharf.
1021 <i>fadD</i> Δ <i>cheA</i>	1021FDCSS conteniendo una deleción en fase del gen <i>cheA</i> , Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Este trabajo
1021 <i>fadD</i> Δ <i>exoX</i>	1021FDCSS conteniendo una deleción en fase del gen <i>exoX</i> , Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Este trabajo
1021 <i>fadD</i> Δ525	1021FDCSS conteniendo una deleción en fase del gen <i>smc00525</i> , Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Este trabajo
1021Δ <i>exoY</i>	Rm1021 conteniendo una deleción en fase del gen <i>exoY</i> , Sm <sup>r</sup>	(Nogales <i>et al.</i> , 2012)
1021Δ <i>exoY</i> flaAB	1021Δ <i>exoX</i> ( <i>flaAflaB</i> :: Hyg <sup>r</sup> ) Sm <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	(Nogales <i>et al.</i> , 2012)
1021Δ <i>cheA</i>	Rm1021 conteniendo una deleción en fase del gen <i>cheA</i> , Sm <sup>r</sup>	Este trabajo
1021Δ <i>exoX</i>	Rm1021 conteniendo una deleción en fase del gen <i>exoX</i> , Sm <sup>r</sup>	Este trabajo
1021Δ <i>exoXY</i>	1021Δ <i>exoX</i> conteniendo una deleción en fase del gen <i>exoY</i> , Sm <sup>r</sup>	Este trabajo
1021Δ525	Rm1021 conteniendo una deleción en fase del gen Δ <i>smc00525</i> , Sm <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4 <i>fadD</i> Δ <i>cheA</i>	GR4FDCSS conteniendo una deleción en fase del gen <i>cheA</i> , Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4 <i>fadD</i> Δ <i>exoX</i>	GR4FDCSS conteniendo una deleción en fase del gen <i>exoX</i> , Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4 <i>fadD</i> Δ <i>exoXY</i>	GR4FDCSSΔ <i>exoX</i> conteniendo una deleción en fase del gen <i>exoY</i> , Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4 <i>fadD</i> Δ525	GR4FDCSS conteniendo una deleción en fase del gen <i>smc00525</i> , Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4Δ <i>cheA</i>	GR4 conteniendo una deleción en fase del gen <i>cheA</i>	Este trabajo
GR4Δ <i>exoX</i>	GR4 conteniendo una deleción en fase del gen <i>exoX</i>	Este trabajo
GR4Δ <i>exoXY</i>	GR4Δ <i>exoX</i> conteniendo una deleción en fase del gen <i>exoY</i>	Este trabajo
GR4Δ525	GR4 conteniendo una deleción en fase del gen <i>smc00525</i>	Este trabajo

1021flaAB	Rm1021( <i>flaAflaB</i> :: Hyg <sup>r</sup> ) Sm <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	(Nogales <i>et al.</i> , 2012)
1021fadDflaAB	1021FDCSS( $\Delta$ <i>flaAflaB</i> :: Hyg <sup>r</sup> ) Sm <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4flaAB	GR4( <i>flaAflaB</i> :: Hyg <sup>r</sup> ) Hyg <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4fadDflaAB	GR4FDCSS( <i>flaAflaB</i> ::Hyg <sup>r</sup> ) Sm <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Este trabajo
1021 $\Delta$ exoXflaAB	1021 $\Delta$ exoX ( <i>flaAflaB</i> :: Hyg <sup>r</sup> ),Sm <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4 $\Delta$ 525flaAB	GR4 $\Delta$ 525( <i>flaAflaB</i> :: Hyg <sup>r</sup> ) Hyg <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4fadD $\Delta$ 525flaAB	GR4fadD $\Delta$ 525( <i>flaAflaB</i> :: Hyg <sup>r</sup> ) Sm <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4flgK	GR4 conteniendo la version mutada <i>flgK</i> ::Tn5 del GNS5. Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4fadDflgK	GR4FDCSS conteniendo la version mutada <i>flgK</i> ::Tn5 del GNS5. Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4 $\Delta$ 525flgK	GR4 $\Delta$ 525 conteniendo la version mutada <i>flgK</i> ::Tn5 del GNS5. Km <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4fadD $\Delta$ 525flgK	GR4fadD $\Delta$ 525 conteniendo la version mutada <i>flgK</i> ::Tn5 del GNS5. Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
1021flgE	Rm1021 conteniendo la version delecionada del gen <i>flgE</i> . Sm <sup>r</sup>	(Nogales <i>et al.</i> , 2012)
1021rhhbD	Rm1021 conteniendo una deleción en fase del gen <i>rhhbD</i> ,Sm <sup>r</sup>	(Amaya-Gómez, 2013)
1021fadDrhhbD	1021FDCSS conteniendo una deleción en fase del gen <i>rhhbD</i> ,Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Este trabajo
1021(pGus3)	Rm1021 portando el plásmido pGus3, Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	(Amaya-Gómez, 2009)
GR4(pGus3)	GR4 portando el plásmido (pGus3) pGus3, Km <sup>r</sup>	(Soto <i>et al.</i> , 2002.)
GR4fadDpRmM57	GR4FDCSS conteniendo el plásmido (pRmM57), Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4fadDpGD499	GR4FDCSS conteniendo el plásmido (pGD499) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4fadD $\Delta$ 525pRmM57	GR4fadD $\Delta$ 525 conteniendo el plásmido (pRmM57) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
GR4fadD $\Delta$ 525pGD499	GR4fadD $\Delta$ 525 conteniendo el plásmido (pGD499) Sm <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	Este trabajo
<b>Otros rizobios</b>		
<i>Rhizobium etli</i>	CFN42, Sm <sup>r</sup>	González <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	3841 derivada de JB300, Sm <sup>r</sup>	(Johnston and Beringer, 1975.)
<i>Sinorhizobium fredii</i>	HH103 <sup>rif</sup>	(Madinabeitia <i>et al.</i> ,2002)

**Tabla 2.** Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmidos	Características relevantes	Referencias
pBSKS(+)	Cloning vector; Ap <sup>r</sup>	Stratagene
pCR®-XL-TOPO®	Vector de clonación para productos de PCR; Km <sup>r</sup>	Invitrogen®
pK18 <i>mobsacB</i>	Plásmido suicida; Km <sup>r</sup>	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pSUP2021	Vector pBR325::mob que contiene el Tn5 . Tcr, Cmr, Apr, Kmr.	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
pUC18	Vector de clonación, Ap <sup>r</sup> .	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pGus3	Plásmido con la fusión entre el promotor del gen <i>nfeD</i> y el gen <i>gusA</i> del pBI100. Km <sup>r</sup>	(Garcia-Rodriguez and Toro, 2000)
pUCGNS5	Derivado de pUC18 con el fragmento <i>EcoRI</i> de 8.5Kb que contiene la inserción del Tn5 del mutante GNS5. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCNS26	Derivado de pUC18 que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> de 10 Kb que alberga la inserción la inserción Tn5 del mutante NS26. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pBSNS26B	Derivado de pBSKS(+) que contiene el fragmento <i>BamHI</i> de 4Kb de pUCNS26. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCNS33	Derivado de pUC18 que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> de 14 Kb que alberga la inserción Tn5 del mutante NS33. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pBSNS33	Derivado de pBSKS(+) que contiene el fragmento <i>BamHI-EcoRI</i> de 4 Kb de pUCNS33. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCGNS43	Derivado de pUC18 que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> de 9.5 Kb que alberga la inserción Tn5 del mutante GNS43. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCGNS43B	Derivado de pUC18 que contiene el fragmento <i>BamHI</i> de 4Kb de pUCGNS43. Ap <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCGSPS51	Derivado de pUC18 que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> de 11 Kb que alberga la inserción Tn5 del mutante GSPS51. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCGNS55B	Derivado de pUC18 que contiene los fragmentos <i>BamHI</i> de 3.8Kb y 3.3Kb que albergan la inserción Tn5 del mutante del GNS55. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCGNS55B1	Derivado de pUC18 que contiene el fragmento <i>BamHI</i> de 3.8Kb de pUCGNS55B1. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCGNS61	Derivado de pUC18 que contiene fragmento <i>EcoRI</i> de 6.6 Kb que alberga la inserción Tn5 del mutante del GNS61. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCGNS62	Derivado de pUC18 que contiene el fragmento <i>EcoRI</i> de 10 Kb que alberga la inserción Tn5 del mutante GNS62. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pBSGNS62B	Derivado de pBSKS(+) que contiene el fragmento <i>BamHI</i> de 3.3 Kb de pUCGNS62. Ap <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCGNS76B	Derivado de pUC18 que contiene el fragmento <i>BamHI</i> de 4 Kb que alberga la inserción Tn5 del mutante GNS76. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pUCNS302	Derivado de pUC18 que contiene el fragmento <i>BamHI</i> de 3.8 Kb que alberga la inserción Tn5 del mutante NS302. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo

pBSPSB	Derivado de pBSKS(+) que contiene el fragmento <i>Bam</i> HI de 9 Kb que alberga la inserción Tn5 del mutante SPS1. Ap <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> .	Este trabajo
pTopo-cheA	Derivado de pCR <sup>®</sup> -XL-TOPO <sup>®</sup> conteniendo la versión delecionada del gen <i>cheA</i> ; Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pTopo-exoX	Derivado de pCR <sup>®</sup> -XL-TOPO <sup>®</sup> conteniendo la versión delecionada de gen <i>exoX</i> ; Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pTopo-525	Derivado de pCR <sup>®</sup> -XL-TOPO <sup>®</sup> conteniendo la versión delecionada del gen <i>smc00525</i> ; Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pTopo-exoY	Derivado de pCR <sup>®</sup> -XL-TOPO <sup>®</sup> conteniendo la versión delecionada del gen <i>exoY</i> ; Km <sup>r</sup>	(Nogales et. al., 2012)
pk18-cheA	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> conteniendo la versión delecionada del gen <i>cheA</i> ; Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pk18-exoX	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> conteniendo la versión delecionada de gen <i>exoX</i> ; Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pk18-525	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> conteniendo la versión delecionada del gen <i>smc00525</i> ; Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pk18-exoY	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> conteniendo la versión delecionada del gen <i>exoY</i> ; Km <sup>r</sup>	Este trabajo
pk18-flaAB	Derivado de pK18 <i>mobsacB</i> conteniendo la versión delecionada del gen <i>flaAflaB</i> ; Hyg <sup>r</sup>	(Nogales et. al., 2012)
pRmM57	Plásmido conteniendo la fusión transcripcional <i>nodC::lacZ</i>	(Mulligan and Long, 1985)
pGD499	Plásmido conteniendo la fusión transcripcional <i>npt::lacZ</i>	(Ditta et al., 1985)

## 1.2 Medios de cultivo.

### Medios de cultivo para *E. coli*

Para el cultivo de *E. coli*, se utilizó habitualmente el medio Luria-Bertani (**LB**), (Miller, 1972), cuya composición es la siguiente:

NaCl.....5 g  
 Triptona.....10 g  
 Extracto de levadura.....5 g  
 Agar (para medio sólido).....15 g  
 Agua desionizada.....1000 ml

El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

### Medios de cultivo para rizobios

El medio completo utilizado para el crecimiento de *S. meliloti* fue el medio Triptona-extracto de levadura (**TY**) (Beringer, 1974), cuya composición es la siguiente:

Triptona.....5 g  
 Extracto de levadura.....3 g  
 CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.....0,9 g  
 Agar (medio sólido).....15 g  
 Agua desionizada.....1000 ml

El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

Como medio mínimo (**MM**) para *Rhizobium* se ha empleado el de Robertsen et al. (1981), modificado según se especifica a continuación:

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,3 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,15 g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O.....	0,05 g
FeCl <sub>3</sub> .....	0,006 g
NaCl.....	0,05 g
Glutamato sódico.....	1,1 g
Manitol.....	10 g
Solución de vitaminas*.....	1 ml
Agar purificado PRONADISA (medio sólido)...	13 g
Agua destilada.....	1000 ml

Para los ensayos de *swarming* se usó una concentración del 0.6% de agar purificado PRONADISA, o agar noble Difco™. Se ajustó a un pH de 6.8-7.2, y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

\*La solución concentrada de vitaminas (1000x) consta de:

Biotina.....	0.2 g
Clorhidrato de tiamina.....	0.1g
Pantotenato sódico.....	0.1g
Agua destilada.....	1000 ml

Se esterilizó por filtración y se adicionó 1 ml/litro al MM autoclavado.

Para los ensayos de *swimming* se utilizó el medio Bromfield (**BM**).

Triptona.....	0.4g
Extracto de levadura.....	0.1g
CaCl <sub>2</sub> .....	0.1g
Agar Bacteriológico.....	3g
Agua destilada.....	1000 ml

### 1.3. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas (100X) de los mismos en agua desionizada y posterior esterilización con unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0.2 µm de tamaño de poro. En el caso de la solución de tetraciclina no fue necesaria



la esterilización por filtración ya que se empleó metanol para disolverla. La concentración final de los distintos antibióticos utilizados en este trabajo se indica en la tabla 3.

**Tabla 3.** Antibióticos

Antibiótico	Concentración (µg/ml)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. meliloti</i>
Ampicilina (Ap)	200	-
Espectinomicina (Spc)	100	100
Sulfato de estreptomina (Sm)	50	200
Sulfato de kanamicina (Km)	50	200
Sulfato de neomicina (Nm)	-	100
Tetraciclina (Tc)	10	10
Hygromicina	-	75

#### 1.4. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se utilizaron criotubos que contenían alícuotas de cultivos en fase logarítmica adicionados con glicerol estéril a una concentración final del 20%. Los criotubos se almacenaron a una temperatura de -80 °C.

#### 1.5. Conjugaciones biparentales

Esta técnica se utilizó cuando fue necesaria la transferencia de un plásmido entre cepas bacterianas. Las conjugaciones se realizaron mezclando un cultivo en fase logarítmica de crecimiento del donador (O.D. 600 nm entre 0.6 y 0.7 para *E. coli* S17-1), con otro en fase exponencial tardía del receptor (O.D. 600 nm superior a 1), en proporción 1:1. Donador y receptor se precipitaron y se lavaron varias veces con medio líquido (el mismo usado para el crecimiento del cultivo) para eliminar restos de antibióticos. Finalmente, la mezcla se resuspendió en un pequeño volumen (30 µl) y se depositó sobre un filtro Millipore estéril de 0.45 µm de poro y 2.5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de medio TY sólido. La mezcla se incubó de este modo durante 16-20h a 28°C. Transcurrido este tiempo la mezcla de conjugación se resuspendió en medio líquido estéril, se lavó y se sembró sobre placas de medio selectivo.

#### 1.6. Transducción

Esta técnica se utilizó para el intercambio alélico entre cepas derivadas de *S. meliloti* 1021 usando el fago φM12 y siguiendo el protocolo descrito en (Finan *et al.*, 1984).

Se mezclaron 5 ml de metió TY semisólido (0.5% agar) fundido adicionado de sulfato de magnesio (2.5 mM MgSO<sub>4</sub>) con 100 µl de un cultivo de la cepa donadora a una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.4-0.5 y 100 µl de una solución de fagos φM12 (10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> ufc/ml). La mezcla se extendió sobre una placa de TY sólido y se incubó a 28°C hasta la aparición de calvas. Para la recuperación de los lisados, se utilizaron placas con 800-1000 clavos a las que se añadieron 3 ml de TY líquido adicionado de sulfato de magnesio (2.5 mM MgSO<sub>4</sub>) y tras mantener las placas de 2 a 4 horas a 4°C, se recuperó el líquido y se eliminaron las bacterias por filtración. Los lisados así obtenidos se titularon y se conservaron a 4°C.

Para la determinación del título de los lisados se emplearon diluciones seriadas del lisado de las que se utilizaron 100 µl para inocular 5 ml de medio TY semisólido adicionado de sulfato de magnesio (2.5 mM MgSO<sub>4</sub>) junto con 100 µl de cultivo bacteriano. La mezcla se tendió en sobrecapa y una vez solidificado el medio, se incubaron a 28°C hasta la aparición de las calvas determinándose de este modo el número de ufc/ml en el lisado.

#### 1.7. Ensayos de movilidad *swarming*

Para mantener la reproducibilidad del comportamiento en *swarming* todos los cultivos líquidos rutinariamente partieron del stock de glicerol. Las cepas de *S. meliloti* se crecieron en agitación a 30 °C en medio TY líquido hasta una O.D. 600 nm de 0.9 -1. Después de la incubación, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con MM y se resuspendieron en este mismo medio en una décima parte del volumen inicial. Aliquotas de 2 µl de esta suspensión, se colocaron sobre la superficie de placas de Petri preparadas con 20 ml de MM conteniendo agar al 0.6% y secadas durante 15 min a temperatura ambiente. Tras la colocación de las gotas, éstas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 min. Las placas se incubaron en posición invertida durante 24 h.

Para facilitar la comparación de las colonias *swarming* de los mutantes construidos con respecto a la cepa parental, se procedió a medir la longitud de cada uno de los lados del teórico rectángulo que engloba a la colonia (en centímetros) y se realizó la media de esos valores. A los resultados obtenidos de un mínimo de tres experimentos independientes (con al menos 3 réplicas técnicas), se les aplicó el error típico con un nivel de confianza del 95%.

### 1.8. Ensayos de movilidad *swimming*

Las cepas de *S. meliloti* se crecieron en agitación a 30 °C en medio TY líquido hasta una O.D. 600 nm de 0.9 -1. Después de la incubación, alícuotas de 3 µl del cultivo se colocaron sobre la superficie de placas de Petri preparadas con 25 ml de BM 0.3% de agar, secadas a temperatura ambiente tapadas. Tras la colocación de las gotas las placas se incubaron boca arriba durante 48h.

Para facilitar la comparación de las colonias *swimming* de los mutantes construidos con respecto a la cepa parental, se procedió a medir el diámetro del halo de dispersión de la colonia a las 48h de incubación y se calculó la media. A los resultados obtenidos de un mínimo de tres experimentos independientes (con al menos 2 réplicas técnicas), se les aplicó el error típico.

### 1.9. Ensayos de formación de biopelículas

#### 1.9.1 Formación de biopelículas en placas multipocillo de cloruro de polivinilo (PVC)

Para la medida de formación de biopelículas en placas multipocillo se siguió el procedimiento descrito por O'Toole et al. (1999) y más recientemente por Fujishige et al. (2006b) con algunas modificaciones. Este ensayo se basa en la capacidad de adhesión de células bacterianas a la superficie de placas de 96 multipocillos de PVC (Falcon 3911, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY).

1. Las cepas de *S. meliloti* fueron crecidas en MM adicionado con antibióticos hasta una O.D. 600 nm de 1.5-2.
2. Los cultivos fueron lavados 2 veces con MM sin hierro.
3. Las células se resuspendieron bien en MM con una concentración de 22 µM FeCl<sub>3</sub> (MM de uso rutinario) o 220 µM de FeCl<sub>3</sub> si se deseaba evaluar la formación de biopelículas en MM en presencia de altas concentraciones de hierro.
4. 150 µl de una dilución a O.D. 600 nm de 0.2 se puso en cada micropocillo. Las placas fueron cubiertas con tapas Falcon 3913, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY e incubadas a 30 °C durante 48 h, sin agitación en una cámara húmeda para evitar la evaporación del medio. La cámara húmeda consistió en un recipiente de plástico con tapa dentro del cual se mantuvo un papel humedecido con agua.
5. Antes de proceder con la tinción de la biopelícula, se verificó que al final del experimento las cepas a estudiar presentaban la misma densidad óptica. Para ello se leyó la O.D. 590 nm de los cultivos crecidos en los

pocillos haciendo uso del lector de placas de micropocillos Elisa Sunrise™ (Tecan Group Ltd, Männedorf, Switzerland).

6. Por aspiración con el kitasato, el medio de cultivo y las células que no se habían adherido a las paredes de los pocillos fueron retirados.
7. Cada pocillo fue teñido con 180  $\mu$ l de una solución de cristal violeta (CV) al 0.1% durante 20 min y posteriormente lavado con 180  $\mu$ l de agua destilada estéril tres veces, dejando el agua de cada lavado durante 5 min.
8. La placa se dejó secar durante al menos 1h a temperatura ambiente en la campana de extracción de gases.
9. Tras desteñir los pocillos con 180  $\mu$ l de una solución 80% etanol/20% acetona, la biomasa adherida fue cuantificada midiendo la O.D. 550 nm en el lector de placas Sunrise™.

El análisis de los datos obtenidos se realizó de al menos 60 pocillos provenientes de tres experimentos independientes. Los datos fueron sometidos a la prueba de Levene para evaluar la igualdad de varianzas con el programa SPS 15.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La diferencia estadística entre la media de los datos fue evaluada por medio de la prueba *t* Student asumiendo varianzas desiguales (Prueba de Welch). Cuando el test de Welch mostró que la diferencia entre la media de los datos tenía una probabilidad  $P < 0.01$  la media de los datos comparados se consideró como distinta.

#### 1.9.2 Formación de biopelícula en tubo de vidrio

- 1) Se parte de un cultivo de la cepa a ensayar crecido en 3ml de MM adicionando los correspondientes antibióticos hasta una  $DO_{600nm}$  1.5-2.
- 2) Incubar los tubos sin agitación a 30 °C durante 24, 48 y/o 72h.
- 3) Retirar con cuidado el cultivo aspirando con el kitasato y evitando tocar el fondo o los bordes del tubo de vidrio.
- 4) Teñir cada tubo con 4 ml de cristal violeta (CV) al 0.1% durante 20 minutos.
- 5) Retirar por aspiración el CV y lavar tres veces cada tubo con 4ml de agua estéril, dejando el agua de cada lavado durante 5 minutos. Retirar el agua por aspiración. Las partículas que no están adheridas deben aspirarse.
- 6) Dejar secar el tubo en posición invertida a  $T^a$  ambiente.

### 1.10. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento se realizaron en placas multipocillo de poliestireno de 9x7.5 cm. Generalmente, se utilizó un medio mínimo (MM) y un medio rico (TY) sin antibióticos para poder hacer comparaciones entre las distintas cepas. En cada pocillo se aplicó 350 µl de un inóculo conteniendo  $5 \times 10^7$  células/ml de medio de cada una de las cepas. Para ello, se hicieron precultivos en TY adicionando los correspondientes antibióticos. Cuando estos cultivos alcanzaron una O.D. 600 nm aproximada de 1 se lavaron dos veces con MM para eliminar los restos de TY y se diluyeron en medio pasivo (MM o TY) hasta obtener aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/ml. En cada experimento se llevaron tres réplicas de cada cepa. La turbidez de los cultivos se determinó a intervalos regulares de tiempo (cada dos horas) durante dos días, en un Microbiology Reader Bioscreen C a 28°C y a una longitud de onda comprendida entre 420-580 nm.

Alternativamente, las curvas de crecimiento se determinaron en tubos de vidrio con 3 ml de TY o MM sin antibióticos. Se partió de una densidad celular inicial de  $5 \times 10^7$  células/ml, diluyendo de un preinóculo de TY crecido con antibióticos hasta O.D. 600 nm = 1. En el caso de la curva realizada con MM fue necesario lavar dos veces y después diluir el cultivo. La turbidez de los cultivos se determinó a intervalos regulares de tiempo en un espectrofotómetro a una O.D. 600 nm.

## **2. Técnicas de biología molecular**

### 2.1. Aislamiento de ADN plasmídico

Según requerimientos, compatibilidades y necesidades se han utilizado 2 métodos distintos:

#### 2.1.1 Mini preparación mediante lisis alcalina

Se llevó a cabo el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores (1989) que consistió en:

1. Inocular la bacteria portadora del plásmido en 3 ml de medio suplementado con los correspondientes antibióticos e incubar a temperatura óptima (37°C para *E. coli*, o 30 °C para *S. meliloti*) durante 12-15 horas.
2. Centrifugar las células en tubos de microfuga (12.000 rpm, 3 min). Retirar el sobrenadante.

3. En el caso de *S. meliloti*, resuspender el sedimento en 200 µl de sarkosyl 0,1% en TE, para eliminar restos de polisacáridos. Centrifugar las células (12.000 rpm, 3 min). Eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender el sedimento en 100 µl de solución I. Dejar 5 min a temperatura ambiente.
5. Añadir 200 µl de solución II. Mezclar por inversión rápida unas 3 veces. Dejar en hielo 5 min.
6. Añadir 150 µl de solución III fría. Mezclar suavemente por inversión manual varias veces. Dejar en hielo 5 min.
7. Centrifugar durante 5 min a 12.000 rpm.
8. Recoger el sobrenadante y adicionar 1 volumen (400 µl, aproximadamente) de una mezcla de fenol/cloroformo (1:1).
9. Agitar con vórtex y centrifugar 5 min a 12.000 rpm.
10. Recoger en un nuevo tubo la fase superior acuosa que contiene el ADN.
11. Añadir 2,5 volúmenes (1ml) de etanol al 100% pre enfriado a -20°C. Mezclar por inversión y dejar a -80°C al menos 30 min.
12. Centrifugar 15 min a 12.000 rpm.
13. Retirar el sobrenadante.
14. Añadir 200 µl de etanol 70% frío y centrifugar 3 min a 12.000 rpm. Eliminar el sobrenadante
15. Secar el precipitado al vacío, 5-10 min, aproximadamente.
16. Resuspender el precipitado en 20 - 40 µl de tampón TE o H<sub>2</sub>O milli-Q. Conservar a -20°C.

SOLUCIONES:

Solución I:

Glucosa 50 mM

EDTA 10 mM

Tris-HCl 25 mM pH 8

Lisozima, 4mg/ml

Solución II:

NaOH 0,2 M

SDS 1%

Solución III:

Acetato potásico 5 M (60 ml)

Ácido acético glacial (11,5 ml)

H<sub>2</sub>O (28,5 ml); pH 4,5.

Tampón TE:

Tris 10 mM

EDTA 1 mM, pH 8.

Mezcla fenol: cloroformo (1:1): El cloroformo es una mezcla de alcohol isoamílico: cloroformo (1:24). El fenol contiene fenol al 100% (1:1), 0,1% 8-hidroxiquinoleína en Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0).

### 2.1.2 Mini preparación de ADN plasmídico con el kit Genelute plasmid (SIGMA)

Este método se utilizó cuando se requería una mayor calidad de la preparación de ADN (ej., para secuenciación). Se procedió, siguiendo las indicaciones del fabricante, como se describe a continuación:

1. Inocular la cepa en 3 ml de medio LB líquido suplementado con los correspondientes antibióticos e incubar a 37 °C durante 12-15 horas.
2. Resuspender las células en 200 µl de solución de resuspensión.
3. Añadir 200 µl de solución de lisis. Mezclar por inversión y dejar aclarar durante 5 min.
4. Añadir 350 µl de solución de neutralización (S3). Mezclar por inversión de 5 a 6 veces.
5. Centrifugar 10 min a 12.000 rpm para separar los restos celulares.
6. Para acondicionar la columna, añadir 500µl de la solución de preparación de columna a una columna previamente colocada sobre un tubo recolector.
7. Centrifugar 1 minuto a 12.000 g, y eliminar el filtrado.
8. Transferir el lisado a la columna.
9. Centrifugar 1 minuto y eliminar el filtrado.
10. Lavar la columna con 500µl de la solución opcional de lavado de columna, centrifugar 1 minuto a 12.000 rpm, eliminar el filtrado.
11. Lavar de nuevo con 750 µl de solución de lavado de columna, centrifugar durante 1 minuto y eliminar el filtrado.
12. Centrifugar 1 minuto para secar bien la columna.
13. Transferir la columna a un nuevo tubo, añadir 50-75 µl de solución de elución y centrifugar 1 minuto para recoger el ADN.

## 2.2. Aislamiento de ADN genómico total

Para la obtención de ADN genómico total de *S. meliloti* se utilizó un método especialmente diseñado para *Rhizobium* en el departamento de Genética de la Universidad de Bielefeld (Alemania), y que consistió en los siguientes pasos:

1. Crecer la cepa de *S. meliloti* en 3 ml de TY líquido adicionado de los correspondientes antibióticos hasta alcanzar una fase logarítmica media.
2. Repartir 1.5 ml del cultivo en tubos eppendorf y centrifugar durante 2 min a 12.000 rpm.
3. Resuspender el sedimento en 200 µl de sarkosyl 0,1% en TE (ver soluciones en apartado 2.2.1.1), para eliminar restos de polisacáridos. Centrifugar las células (12.000 rpm, 3 min) y eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender las células en 1 ml NaCl 1 M y dejar la suspensión al menos 30 min a 4 °C, agitando de vez en cuando.
5. Centrifugar (12.000 rpm, 3 min), y eliminar el sobrenadante.
6. Resuspender el sedimento de células en 250 µl de una solución de sacarosa 20% en TE.
7. Añadir 250 µl de una solución en TE que contiene lisozima (5 mg/ml) y RNasa (1 mg/ml), agitar por inversión e incubar 30 min a 37 °C.
8. Adicionar 100 µl de una solución en TE que contiene sarkosyl 5% y pronasa (10 mg/ml) e incubar 1 hora a 37°C.
9. Añadir 70 µl de acetato sódico 3M pH 5,2, 200 µl de mezcla fenol-cloroformo (ver soluciones en apartado 2.2.1.1), y 200 µl de fenol (kirby mix). Agitar en vórtex durante 2-3 min.
10. Centrifugar (12.000 rpm, 5 min) y recoger la fase superior acuosa en otro tubo.
11. Añadir 300 µl de cloroformo, agitar y centrifugar (12.000 rpm, 3 min).
12. Recoger la fase superior en otro tubo eppendorf, añadir 700 µl de isopropanol, agitar, y mantener a -80°C al menos 30 min.
13. Centrifugar 15 min a 12.000 rpm, y eliminar sobrenadante.
14. Añadir 300 µl de etanol 70%, centrifugar 3 min.
15. Eliminar sobrenadante y secar al vacío 5-10 min aproximadamente.
16. Resuspender en 100 µl de TE pH 8 diluido 1/10, e incubar 30 min a 65°C.

## 2.3. Aislamiento de ARN total de *S. meliloti*

Para la obtención de ARN total de *S. meliloti* se utilizó el RNase-free DNase kit de Quiagen. Se tomaron 12 alícuotas de 1.5 ml de cada cepa o condición a



evaluar. Las células fueron centrifugadas y tras retirar el sobrenadante, lavadas con una solución de sarkosyl al 0.1% en tampón TE. A continuación el pellet celular fue congelado en nitrógeno líquido y guardado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Cuando se deseaba recoger células “swarmer”, se añadieron 2 ml de MM en la superficie de la placa del medio semisólido. Haciendo uso de una espátula de vidrio las células “swarmer” fueron desprendidas de la superficie y recogidas para luego proceder con el lavado y su congelación en nitrógeno líquido.

1. En el momento de su uso se descongelaron en hielo 4 viales de células por cada cepa u condición y se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de una solución de lizosima 4mg/ml en tampón TE, se mezcló mediante vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
2. A la muestra se añadieron 350  $\mu\text{l}$  de tampón RTL al que previamente se le habían adicionado 10  $\mu\text{l/ml}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol. Se mezcló por inversión manual y se centrifugó 5 min a 13.000 rpm para eliminar los restos celulares.
3. En el sobrenadante se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto y se mezcló por inversión manual.
4. Por cada columna de purificación se pasaron 2 viales, centrifugando 30 seg a 13.000 rpm y eliminando el sobrenadante cada vez.
5. A continuación se lavó cada columna con 750  $\mu\text{l}$  de solución RW1 y se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 seg.
6. Tras cambiar las columnas a nuevos tubos de recolección, se lavó la columna dos veces añadiendo 500  $\mu\text{l}$  de buffer RPE y centrifugando a 13.000 rpm durante 30 seg.
7. Los restos de solución fueron eliminados centrifugando las columnas a 13.000 durante 2 min.
8. La columna de purificación se colocó en un nuevo tubo de microfuga y se añadieron 30  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de RNAsa. Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente para hidratar la resina y se centrifugó 1 min a 13.000 rpm. Este paso se repitió, y se mezcló el ARN procedente de las dos extracciones realizadas para cada muestra hasta obtener un volumen final de 60  $\mu\text{l}$ .
9. Al volumen total obtenido (120  $\mu\text{l}$ ) se añadieron 14  $\mu\text{l}$  de solución buffer RDD (RNAase free DNase set, Quiagen) y 6  $\mu\text{l}$  de DNasa. La mezcla se incubó durante dos horas a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

10. A continuación a los 140  $\mu\text{l}$  de solución que contenían el ARN se añadieron 490  $\mu\text{l}$  de la solución RTL con  $\beta$ -mercaptoetanol, 350  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto y se mezcló por inversión.

11. La solución se pasó por una columna RNeasy para retener el ARN (13.000 rpm durante 30 seg) y se continuó con su lavado.

12. La columna se lavó con 350  $\mu\text{l}$  de solución RW1 y se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 seg.

13. La columna se lavó dos veces añadiendo 500  $\mu\text{l}$  de buffer RPE centrifugando a 13.000 rpm durante 30 seg.

14. Los restos de solución fueron eliminados centrifugando las columnas a 13.000 durante 2 min.

14. Finalmente, se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de agua RNase free sobre la resina de la columna. Esta se dejó hidratar por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugo durante 30 seg a 13.000 rpm. Este paso se repitió dos veces para obtener un volumen final de ARN de 50  $\mu\text{l}$ .

#### 2.4. Concentración de muestras de ARN total *de S. meliloti*

Las muestras de ARN se concentraron utilizando columnas Microcon -30 (Amicon, Millipore). Primero se añadieron 500  $\mu\text{l}$  de agua libre de RNasa a la muestra de ARN. A continuación se pasó la mezcla por la columna centrifugando a 14.000 xg hasta que sobre la membrana quedaron unos 35  $\mu\text{l}$  (6-8 min). La muestra concentrada se recuperó invirtiendo la columna sobre un nuevo microtubo y centrifugando a 1.000 xg durante 2 min.

#### 2.5. Estimación de la concentración de ADN y ARN

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito por Sambrook ((Maniatis *et al.*, 1989). La absorbancia (O.D.260 nm y O.D.280 nm) de las soluciones de ADN o ARN en agua o en TE se terminaron usando como blanco agua o TE, respectivamente. La concentración se calculó respecto a los valores estándar de O.D. 260 nm = 1 para soluciones con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADN de cadena doble. En el caso de muestras de ARN se determinó su concentración a través de valores estándar de O.D. 260 nm = 1 en soluciones con 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ARN en espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.). Para estimar la pureza de muestras de ADN se tomó la relación O.D. 260 nm/O.D. 280 nm, considerándose valores inferiores a 1.8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de

baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook. En el caso de muestras de ARN se rechazaron aquellas muestras cuya relación O.D. 260 nm/O.D. 280 nm mostró valores inferiores a 2.0 por falta de pureza.

## 2.6. Manipulación del ADN

### 2.6.1 Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción.

La digestión total de ADN con enzimas de restricción se llevó a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones, en cuanto a temperatura y tampón, recomendadas por el proveedor (Roche®, Alemania). Las digestiones con más de una enzima de restricción se realizaron simultáneamente usando el tampón y la temperatura recomendadas por el proveedor.

### 2.6.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación de fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 0.8% sumergidos en tampón de electroforesis TBE (Tris 50 mM; EDTA- $\text{Na}_2$  2,5 mM;  $\text{BO}_3\text{H}_2$  50 mM; pH 8.2). El voltaje usual de trabajo fue 90 V en cubetas de electroforesis Wide mini-sub® cell GT o Mini-sub® cell GT (BioRad). Como tampón de carga se utilizó una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0.25%, ambos preparados en agua destilada.

### 2.6.3 Revelado de geles y fotografía

Las muestras de ADN presentes en los geles de agarosa se visualizaron tras la inmersión de los geles en agua destilada que contenía una solución de GelRed™ (Biotium) (100  $\mu\text{l/L}$ ), durante 30-40 min. Posteriormente se observaron con luz UV (260 nm) en un transiluminador. Para la visualización e impresión se ha utilizado una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes (Gelprinter Vm509) y el analizador de imágenes Quantity One de BioRad.

### 2.6.4 Estimación del tamaño molecular de los fragmentos de ADN

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se ha efectuado mediante la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo de tamaño molecular relativo de moléculas patrón de ADN frente a la movilidad relativa ( $R_f$ ) de las mismas en el gel de agarosa. Como marcadores

de tamaño molecular se han utilizado los fragmentos de restricción del ADN del fago lambda resultantes de la digestión con *Hind*III (Marcador II), o *Eco*RI/*Hind*III (Marcador III), ambos de Roche. También se ha utilizado el marcador de 100 pb GeneRuler (Fermentas).

#### 2.6.5 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Para aislar fragmentos de ADN de la agarosa se utilizó el método de electroelución descrito por (Sambrook and Fritsch, 1989), en el que se hace uso de membranas de diálisis. La membrana de diálisis utilizada fue de Spectra/por (SPECTRUM Medical Industries) con tamaño de poro de 12.000 a 14.000 Da. Las membranas se prepararon sumergiéndolas en un volumen abundante de tampón conteniendo bicarbonato sódico 2% (p/v) y EDTA 1 mM, y llevándolas a ebullición durante 10 min. Posteriormente, las membranas se lavaron con agua desionizada y se añadió un poco de etanol 100% para su conservación a 4°C. Previo a su uso, las membranas se enjuagaron con agua desionizada. El proceso de electroelución se llevó a cabo con los siguientes pasos:

1. Cortar del gel de agarosa el fragmento que contiene el ADN de interés, e introducirlo en el tubo de diálisis sellado previamente en uno de sus extremos con una pinza.
2. Añadir 500 µl de TBE (ver apartado 2.5) y cerrar el otro extremo del tubo con una segunda pinza, intentando no dejar grandes burbujas de aire.
3. Colocar la bolsa de diálisis en una cubeta de electroforesis, y aplicar un voltaje de 120 voltios durante 20 min.
4. Invertir la polaridad durante 1 minuto y comprobar con el uso de luz UV que no queda ADN en el fragmento de agarosa.
5. Recoger la solución de TBE con el ADN y colocarla en un tubo eppendorf.
6. Precipitar el ADN añadiendo 50 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2, y 2 volúmenes de etanol 100% (1 ml).
7. Agitar por inversión y dejar 20 min a -80°C
8. Centrifugar 15 min a 12.000 rpm y eliminar el sobrenadante.
9. lavar con etanol 70% (200µl). Secar el precipitado al vacío. Resuspender en 20 µl de agua Milli-Q o TE (ver soluciones en apartado 2.1.1).

Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

1.- En un tubo eppendorf, adicionar:

- x  $\mu$ l de ADN vector\*
- y  $\mu$ l de ADN inserto\*
- 1  $\mu$ l de ADN ligasa del fago T4 (1 unidad/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l de tampón de la ligasa (concentrado 10x)
- H<sub>2</sub>O milli-Q, completar hasta 20  $\mu$ l.

2. Mezclar suavemente e incubar a temperatura 15 °C durante toda la noche.

\*Se ha de mantener la proporción vector: inserto en relación (molar) 1:3. La cantidad x+y debe ser de unos 200 ng.

## 2.7. Preparación de células competentes de *E. coli*

La preparación de células competentes de *E. coli* se ha realizado esencialmente según la técnica descrita por Lederberg and Cohen (1974).

1. Inocular la cepa de *E. coli* en 3ml de LB líquido e incubar a 37 °C 12-15 h.
2. Diluir 1 ml del cultivo anterior en 100 ml de LB líquido preparado previamente en un matraz de 250 ml. Incubar a 37 °C hasta alcanzar una O.D. 600 nm de 0.5 (aproximadamente 2 horas).
3. Dejar en hielo 10 min.
4. Centrifugar a 6.000 xg, 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante.
5. Resuspender las células en 1 volumen de una solución MgCl<sub>2</sub> 0,1 M estéril y preenfriada a 4 °C.
6. Centrifugar a 3.000 xg, 5 min a 4 °C y eliminar el sobrenadante.
7. Resuspender el precipitado de células en 1/2 volumen de una solución de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M estéril y preenfriada a 4 °C.
8. Dejar las células en hielo durante al menos 30 min.
9. Centrifugar a 3.000 xg, 5 min a 4 °C, y retirar cuidadosamente el sobrenadante.
10. Finalmente, resuspender suavemente las células en 1/10 volumen de una solución estéril de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M conteniendo glicerol al 20% (p/v) preenfriada a 4 °C.
11. Repartir las células en alícuotas de 200  $\mu$ l en tubos eppendorf preenfriados en hielo.
12. Conservar a -80°C. La competencia de las células se mantuvo de esta forma durante varios meses.

## 2.8. Transformación de células competentes de *E. coli*

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico se siguió la técnica descrita por Rodriguez and Tait (1983), modificada como se indica a continuación:

1. Descongelar las alícuotas de 200  $\mu$ l de células competentes guardadas a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , manteniéndolas en hielo (10-15 min).
2. Añadir 50-100 ng del ADN con el que se pretende transformar. Mezclar mediante agitación suave e incubar en hielo al menos 30 min.
3. Dar un choque térmico 5 min a  $37^{\circ}\text{C}$  y rápidamente pasar a hielo y dejar otros 5 min.
4. Añadir 1 ml de LB e incubar durante 1:15-1:30 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ .
5. Sembrar en placas de LB con los correspondientes antibióticos\*, diferentes volúmenes de la transformación e incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una noche.

\*Si se lleva a cabo una selección por color se puede adicionar a cada placa 40  $\mu$ l de una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal), o 40  $\mu$ l de una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-ácido glucurónico (X-gluc), preparados ambos a una concentración de 20 mg/ml en dimetilformamida.

## 2.9. Experimentos de hibridación ADN-ADN

### 2.9.1 Transferencia de ADN a filtros de nylon

Se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Southern (1975). Para ello:

1. Realizar una electroforesis en agarosa al 0.8%. La concentración de agarosa puede variar según el tamaño de los fragmentos que se quieran separar. Es conveniente emplear un voltaje bajo cuando se quiera transferir ADN total digerido con alguna enzima de restricción.
2. Tinción del gel con GelRed<sup>TM</sup> (Biotium) y fotografía del mismo.
3. Depuración ácida del ADN: sumergir el gel en HCl 0.25 M hasta viraje del azul de bromofenol a amarillo (20 min). Lavar con agua destilada 3 veces.
4. Desnaturalización alcalina del ADN: sumergir el gel durante 20 min en una solución NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M. Repetir el proceso. Lavar el gel con agua destilada.

5. Neutralización del ADN: sumergir el gel en una solución Tris-HCl 0.5 M, NaCl 1.5 M (pH: 7.4) durante 15 min dos veces. Retirar la solución y lavar con agua destilada.
6. Humedecer una membrana de nylon (Roche®), cargada positivamente, en SSC 10x durante al menos 5 min. El tamaño de la membrana debe ser igual al del gel. Recortar también dos piezas de papel Whatman 3 mm del mismo tamaño y otra de mayor tamaño que el gel, y saturarlas en tampón SSC 10x.
7. Sobre una superficie regular, habitualmente un cristal, construir una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por una pieza de papel Whatman 3 mm, cuyos extremos, a modo de mecha se sumergen en un reservorio de tampón de transferencia SSC 10x, el gel, el filtro de nylon y las dos piezas restantes de papel Whatman 3 mm. Colocar un marco de plástico que bordeee todo el sistema y, a continuación, cubrir con papel absorbente. Sobre todo el conjunto se coloca una placa de vidrio y, sobre ésta, un peso de aprox. 0,5-1 Kg para mantener el sistema ligeramente comprimido. Comprobar que el sistema está perfectamente horizontal, y dejar la transferencia toda la noche. Finalizado el proceso, lavar la membrana con SSC 2x durante 5 min. Dejar secar la membrana a temperatura ambiente durante 30 min y finalmente fijar el ADN a la membrana mediante calentamiento en vacío, a 120°C durante 30 min.

#### SOLUCIONES:

SSC 20x:

175.3 g de NaCl

8.2 g de citrato sódico

800 ml de H<sub>2</sub>O destilada. Ajustar el pH a 7,0 y completar hasta 1 litro.

#### 2.9.2 Marcaje de sondas de ADN no radioactivas

El marcaje de sondas de ADN se ha realizado empleando el sistema no radioactivo comercializado por Roche®, siguiendo las recomendaciones del proveedor. Esta técnica consiste en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utiliza el ADN molde desnaturalizado por calor (100 °C, 10 min) y enfriado en agua/hielo durante 2 min, una mezcla de hexanucleótidos, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y una mezcla de dNTPs que incluye dUTP marcado con digoxigenina, nucleótido que se puede detectar mediante reacción

inmunológica específica. La cantidad de ADN molde que se empleó fue de entre 100-500 ng, en un volumen final de 20  $\mu$ l, preferiblemente linearizado mediante la digestión con una enzima de restricción. El tiempo de incubación fue de unas 20 horas, y la temperatura de 37 °C.

### 2.9.3 Hibridación ADN-ADN con sondas de ADN no radioactivas

El proceso de hibridación utilizando ADN homólogo como sonda se efectuó de la siguiente manera:

1. Prehibridación: mantener la membrana de nylon inmersa en 30 ml de solución de prehibridación durante al menos 2 horas, a 42°C.
2. Hibridación: tras eliminar la solución de prehibridación, adicionar nueva solución de prehibridación con el ADN sonda (100 mg/ml solución) previamente desnaturalizado por calor (100°C, 10 min) y enfriado en agua/hielo durante otros 2 min. Incubar durante al menos 6 horas a 42°C.
3. Tras la hibridación, se realizaron los siguientes lavados: 2 x 5 min en 100 ml de SSC 2x; SDS 0,1% a temperatura ambiente; 2 x 15 min en 100 ml de SSC 0.1x; SDS 0.1% a 68 °C.
4. Lavar 1-5 min en tampón I.
5. Incubar 30 min en tampón II.
6. Detección inmunológica: incubar durante 30 min con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) diluidos 1:10.000 en tampón II.
7. Lavar (2 x 15 min) con tampón de lavado, formado por tampón I + Tween 20 al 0,1%.
8. Incubar 5 min con tampón III.
9. Incubar la membrana 5 min en 10 ml de CSPD (Roche) (1:100 en tampón III), evitando incidencia de la luz.
10. Envolver la membrana en plástico transparente e incubar a 37 °C durante 15 min.
11. Exponer la membrana a una película autorradiográfica (Kodak X-Omat®). El tiempo de exposición (30 min a 6 h) varía en función de la concentración de ADN, el porcentaje de homología entre los ADNs sonda y problema y la eficiencia del marcaje.
12. Para el revelado de las películas se emplearon el revelador y el fijador de TETENAL® a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.



SOLUCIONES:

Solución de prehibridación:

SSC 5x

formamida 50%

Reactivo de bloqueo 2% (p/v) (Roche)

N-lauryl-sarcosina 0.1%

SDS 0,02%

Tampón I:

Tris-HCl 100 mM (pH 7.5)

NaCl 150 mM

Tampón II:

Tampón I

Reactivo de bloqueo 1%

Tampón III:

Tris-HCl 100 mM (pH 9.5)

NaCl 100 mM

## 2.10. Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica de PCR se llevó a cabo preparando una mezcla de reacción con tampón de PCR (10x),  $\text{Cl}_2\text{Mg}$  1.5 mM, dNTPs 0.3 mM, 50 pmoles de cada cebador, 10-50 ng de ADN molde y 2 unidades de Taq (Biotherm) en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ . Para el proceso se utilizó un termociclador Thermo (Electron Corporation) con un programa básico que consistió en un ciclo de desnaturalización a 94 °C de 5 min, 30 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización (94 °C, 1 min), apareamiento del cebador (55-58 °C dependiendo de la secuencia del cebador, 1 min) y extensión (72 °C, 1-4 min según la longitud del fragmento a amplificar) y finalmente un último ciclo de extensión (72°C, 10 min). Los cebadores empleados en este trabajo se describen en la Tabla 3.4.

**Tabla 4.** Cebadores empleados para PCR

Oligo	Secuencia (5' a 3')*
Universal	GTAAAACGACGGCCAGT
Reverso	GAAACAGCTATGACCATG
IS50(1)	CACGATGAAGAGCAGAAG
IS50(2)	TAGGAGGTCACATGGAAGTCAGAT
ARB2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
ARB6	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNACGCC
Tn5	AAAGGTTCCGTTTCAGGACGC
0C5251	CACGCAAGCTTTCCTTCGGGGTAGAAGAACAG ( <i>HindIII</i> )
0C5252	CGTTTCCGAGCAGGGAGGAGCGAGCAGCAGAG
0C5253	GCTGCTCGCTCCTCCCTGCTCGGAAACG
0C5254	GTTATGGATCCTACGAGTTCTGGCAGTAC ( <i>BamHI</i> )
exoX1	AATAAGCTTGGACTTCATAGAGGTGACTC ( <i>HindIII</i> )
exoX2	GCTCAGGAATTGAGGGTGCGAACATGGC
exoX3-2	GCCATGTTTCGCACCCTCAATTCCTGAGCGGC
exoX4	AATGGATCCGAGCGTAGAGATCGTAATC ( <i>BamHI</i> )
cheA1	AACAAGCTTTGTGTCCAGGTGCTCATG ( <i>HindIII</i> )
cheA2	CAGGTTTCAGGGATCTTGATGGAATGGACCG
cheA3	TCCATTCCATCAAGATCCCTGAAACCTG
cheA4	AACGGATCCTCGTGAGATGCGAAAGCATG ( <i>BamHI</i> )
exoY1	AAA GGATCC ACCTCATAAGAGTTGTTGCC( <i>BamHI</i> )
exoY2	GGACATATTGCGTGTGTTGCCATACCTCC
exoY3	GGAGGTATGGCAAACACGCAATATGTCC
exoY4	AAA GGATCC AATACCGTCAAATTGGGAGC( <i>BamHI</i> )

Los sitios de restricción usados en clonación están subrayados y las enzimas se indican entre paréntesis.

### 2.11. Mutagénesis in vitro por delección mediante PCR solapante

Las versiones delecionadas de los distintos genes se han obtenido fusionando, mediante reacción de PCR, dos amplicones solapantes, correspondientes al ADN que flanquea a izquierda y derecha la delección, metodología basada en Ho et al. (1989) y Griffiths and Long (2008).

Para la amplificación de las regiones de ADN que flanquean a derecha o izquierda la delección deseada, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando 10 ng de ADN genómico de Rm1021 como ADN molde, tampón PCR Accutherm (10x), 0.2 unidades de Accutherm (polimerasa usada en lugar de Taq polimerasa Biotherm) para evitar generar mutaciones no deseadas aguas arriba o abajo del gen por errores de la polimerasa, 50 pmoles de los cebadores correspondientes al fragmento a amplificar (tabla 3.4) y completando con agua desionizada hasta un volumen de 50  $\mu$ l.

Dicho proceso se llevó a cabo mediante un termociclador Thermo (Electron Corporation) con un programa básico consistente en un ciclo de desnaturalización a 94°C durante 5 min, 30 ciclos de tres pasos cada uno:

desnaturalización (94°C, 30 seg), apareamiento del cebador (57-60°C dependiendo de la secuencia de los cebadores, 30 seg) y extensión (68° C, 30 seg-2 min según la longitud del fragmento a amplificar).

Para obtener el producto de fusión, se realizó una segunda reacción de PCR utilizando 2 ng de cada uno de los flancos obtenidos previamente. El producto de fusión tiene un tamaño que oscila entre 1.4-1.5 kb con aproximadamente 700 pb correspondientes a cada flanco.

Los cebadores empleados para la secuenciación de las versiones delecionadas de los genes, han sido los descritos en la tabla 3.4.

#### 2.12. Secuenciación automática de ADN de doble cadena

Las reacciones de secuenciación se realizaron en un termociclador Perkin Elmer 9.600, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la polimerasa Amplitaq FS, por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra y el de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Al ADN a secuenciar (0.4-1 µg) se le adicionó el cebador específico (6.4 picomoles) y agua Milli Q hasta un volumen final de 12 µl.

#### 2.13. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas

Los análisis de las secuencias de ADN y proteínas, búsqueda de sitios de restricción, diseño y análisis de oligonucleótidos, localización de posibles marcos abiertos de lectura (ORFs), etc., se han realizado con el programa informático Vector NTI®. La búsqueda de homologías a nivel de ADN y proteína con secuencias conocidas presentes en los bancos de datos se realizó con el programa BLAST (Altschul *et al.*, 1998) disponible en el servidor NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Los datos sobre el genoma de *S. meliloti* Rm1021 se consultaron en <http://sequence.toulouse.inra.fr/>.

## 2.14. Experimentos de *microarrays*

### 2.14.1 Reversotranscripción del ARN

1. Se tomaron 15 µg de ARN total de *S. meliloti* concentrado y se llevaron a un volumen final de 13 µl con agua libre de RNAsa. Se añadieron 2 µl de una mezcla de hexanucleótidos (5 µg/µl) y se incubó a 70 °C durante 10 min.
2. A continuación se dejó enfriar en hielo durante 5 min y se añadieron 6 µl de solución 5xRT (Stratagene), 3 µl de solución 0.1 M de DTT (Stratagene), 0.5 µl de inhibidor de RNasa (40 U/µl), 1.5 µl de reverso transcriptasa (Superscript II, Stratagene) y 0.6 µl de una solución madre de dNTPs que incluía dUTP amino modificado (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 5 mM dTTP, y 20 mM aa-dUTP). Los componentes de la reacción se mezclaron y se mantuvieron durante una hora a 42 °C. Transcurrido este tiempo se añadió 1 µl más de reverso transcriptasa (Superscript II, Stratagene) y se dejó transcurrir la reacción durante otra hora hasta la obtención de la muestra final de ADNc.

### 2.14.2 Hidrólisis de ARN

1. Se adicionaron a la muestra 15 µl de NaOH 0.2 M, se mezcló bien y se incubó a 70 °C durante 10 min.
2. A continuación se neutralizó el pH añadiendo 15 µl de HCL 0.2 M y se procedió a limpiar el cDNA utilizando columnas CyScribe GFX (Amsterdam Biosciences). Para ello se mezcló la muestra con 450 µl de tampón de captura, esta fue puesta en columna CyScribe GFX y se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 seg.
3. La columna se lavó dos veces con 600 µl de etanol al 80% y se centrifugó una vez más a 13.000 rpm durante 10 seg para eliminar restos de líquido.
4. La columna fue colocada en un nuevo tubo contenedor, se añadieron 60 µl de NaCO<sub>3</sub> 0.1 M a pH y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Para recuperar el cDNA se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min. A continuación se procedió con el marcaje del cDNA.

### 2.14.3 Marcaje del cDNA

El cDNA se marcó utilizando como fluoróforo Cy3 para la muestra o condiciones control y Cy5 para la muestra o condición problema. Tanto los

fluoróforos como las muestras marcadas se mantuvieron protegidos de la luz a lo largo de todo el proceso.

1. Los fluoróforos de Amersham se disolvieron en 10  $\mu\text{l}$  de DMSO (es importante que el DMSO no contenga agua) y se separaron 10 alícuotas de 1  $\mu\text{l}$  del fluoróforo que se desecaron en "Speed-vac" y se conservaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en bolsas selladas con un paquete de sílica gel para evitar su hidratación.
2. Para llevar a cabo la reacción de marcaje, se transfirió la muestra a un microtubo con una alícuota del fluoróforo correspondiente y se resuspendió pipeteando. Alternativamente se puede añadir 1  $\mu\text{l}$  del fluoróforo recién resuspendido en DMSO y pipetear hasta obtener una suspensión homogénea. Se dejaron transcurrir 2 horas manteniendo la suspensión a temperatura ambiente en oscuridad.
3. A continuación se procedió a neutralizar los fluoróforos que pudieran haber quedado libres añadiendo 4.5  $\mu\text{l}$  de hidroxilamina 4 M, mezclando suavemente y dejando la mezcla 15 min más a temperatura ambiente en oscuridad.
4. Las muestras marcadas con Cy3 y Cy5 que constituían una sonda se mezclaron en este momento y se purificaron juntas utilizando el CyScribe GFX Purification Kit (Amersham Biosciences) según las instrucciones del fabricante. La muestra marcada con Cy5 se mezcló con 600  $\mu\text{l}$  de solución de captura y luego se añadió la muestra marcada con Cy3.
5. Tras pipetear repetidas veces para obtener una mezcla homogénea, está se aplicó a una columna CyScribe GFX. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 seg para eliminar restos de líquido.
6. La columna fue lavada tres veces con 600  $\mu\text{l}$  de buffer de lavado, centrifugando durante 30 seg a a 13.000 rpm.
7. La columna se centrifugó 30 seg más para eliminar los restos de líquido.
8. La columna fue colocada en un nuevo microtubo oscuro y se añadieron 60  $\mu\text{l}$  de solución de elución. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min para recuperar el cDNA marcado. El cDNA marcado de esta forma puede mantenerse a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización.

#### 2.14.4 Procesamiento del microarray previo a la hibridación

Los Sm14koligo microarray que se han utilizado son cristales QMT con grupos epoxi a los que se unen los oligonucleótidos. Cada Sm6koligo microarray contiene 6212 oligonucleótidos de 70 de monómeros de bases que representan todos los ORFs contemplados en la anotación de *S. meliloti* Rm1021 (Rüberg *et al.*, 2003). Recientemente se han dispuesto los Sm14koligo microarrays, los cuales contienen 6208 oligonucleótidos de 70 monómeros de bases que representan todos los ORFs y además 8080 oligonucleótidos de 50 a 70 monómeros de bases que representan las regiones intergénicas contempladas en la anotación de *S. meliloti* Rm1021. Estos cristales deben ser procesados antes de la hibridación para bloquear los grupos epoxi libres, para ello:

1. Los cristales se lavaron durante 5 min a temperatura ambiente en solución 1 (250 µl de Triton X100 en 250 ml de agua MilliQ, disolver calentando 5 min a 80 °C y dejar enfriar a temperatura ambiente antes de usar).
2. A continuación esto fueron lavados dos veces durante 2 min a temperatura ambiente en solución 2 (50 µl de HCl 37% en 500 ml de agua MilliQ).
3. Los cristales se mantuvieron durante 10 min a temperatura ambiente en solución 3 (25ml de 1mM KCl 1 M en 225 ml de agua MilliQ) y se aclararon 1 min en agua MilliQ a temperatura ambiente.
4. Finalmente, los cristales fueron transferidos a la solución de bloqueo (150 ml de agua MilliQ, 40 µl de HCl 37% y 50 ml de 4xQMT blocking solution) que se preparó en el momento y se precalentó a 50°C antes de su uso. Los cristales se mantuvieron en la solución de bloqueo a 50 °C durante 15 min en un contenedor de cristal, se aclararon 1 min en agua MilliQ a temperatura ambiente y se secaron por centrifugación a 1.200 rpm durante 3 min.

#### 2.14.5 Hibridación de los microarrays

Las muestras de cDNA marcado se desecaron utilizando un “Speed-vac” y se resuspendieron en 45 µl de DIG Easy Hyb pipeteando varias veces y se incubó a 65°C durante 5-10 min. Los cristales pretratados según las instrucciones del apartado 3.2.19.4. Se colocaron a 42°C en las cámaras de hibridación para evitar las posibles precipitaciones debidas a gradientes térmicos. La sonda se aplicó como una gota sobre el cristal y se colocó el cubre objetos de modo que

no quedaran burbujas. La incubación se llevó a cabo en un incubador Thermomixer confort (Thermomixer confort, Eppendorf) a 42 °C durante 14-18 h.

#### 2.14.6 Procesamiento del *microarray* tras la hibridación

Transcurrido el tiempo de hibridación, los cristales se lavaron primero con una solución 2x SSC y SDS al 0.1% (p/v) durante 1 min a temperatura ambiente, otras dos veces con una solución 0.2x SSC durante 1 min a temperatura ambiente y finalmente una vez con una solución 0.1x SSC preenfriada a 18 °C durante 1 min. Por último, los cristales se secaron por centrifugación a 1.200 rpm durante 5 min a 4°C y se dejaron a temperatura ambiente un mínimo de 20 min más antes de escanearlos. Durante todo el proceso los cristales se mantuvieron en oscuridad en la medida de lo posible.

#### 2.14.7 Adquisición de la imagen y tratamiento de los datos

Se utilizó un escáner confocal (ScanArray4000) para la obtención de las imágenes correspondientes a la utilización de los láseres de 555 nm y 647 nm para detección de la fluorescencia de Cy3 y Cy5, respectivamente. Para la obtención de los datos se utilizó el programa ImaGene 5.5. (Biodiscovery Inc. Los Angeles, Calif., USA) que determinó la intensidad de los distintos puntos impresos en el cristal así como la intensidad del fondo asociado a cada punto y la calidad del punto (según su forma, tamaño, intensidad respecto al fondo). Se obtuvo el valor del  $\log_2$  de la relación entre las intensidades detectadas de cada fluoróforo para cada punto (M) mediante la formula  $M_i = \log_2 (R_i G_i)$  siendo  $R_i = I_{ch1i} - B_{gch1i}$  y  $G_i = I_{ch2i} - B_{gch2i}$  donde  $I_{ch1i}$  o  $I_{ch2i}$  es la intensidad de un punto en el canal 1 o el 2, respectivamente. También se calculó la intensidad media para cada punto (A) según la formula  $A_i = \log_2 (R_i G_i) / 0.5$ . Cada experimento se llevó a cabo por triplicado. Para la normalización de los datos y el análisis estadístico de las réplicas se utilizó el programa EMMA1.1 (Dondrup *et al.*, 2003) con el que se obtuvieron los correspondientes valores de M y A una vez normalizados y promediados en las réplicas con una calidad aceptable (n) junto con el valor de fidelidad de estos datos (p) según una *t* de Student. Se consideraron como diferencialmente expresados aquellos genes para los que  $n \geq 5$ ,  $P \leq 0.05$ ,  $A \geq 9$  y  $M \geq 1$  o  $M \leq -1$  (es decir, si su expresión variaba cuatro veces como mínimo entre ambas condiciones experimentales) en al menos 2 de los 16 experimentos que se llevaron a cabo.

## 2.15. RT- qPCR (Reverse transcription quantitative real-time PCR)

### 2.15.1 Síntesis de cDNA para RT-qPCR

La síntesis de cDNA para RT-qPCR se realizó desde las muestras de ARN total (adquirido tal y como se describe en la sección 2.3.) siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

1. Se mezclaron 1 µg de ARN total, 1 µl de una solución conteniendo 100 ng/µl de una mezcla de oligonucleótidos (Random Primers, Roche), 1 µl de una mezcla 10 mM de dNTP y se completó el volumen hasta 12 µl con agua milliQ.
2. La muestra fue incubada a 65 °C durante 5 min y transferida inmediatamente a hielo.
3. Se añadieron 5 µl de tampón de síntesis 5x (First-strand, Invitrogen), 2 µl de 0.1 M DTT y 1 µl de inhibidor de ARNasa (40 U/µl, Protector RNase inhibitor. Roche)
4. La mezcla se incubó a 25 °C durante 2 min, se añadió 1 µl de reverso transcriptasa (Superscript II reverse transcriptase, 200 U/µl, Invitrogen) y se incubó a 25 °C durante 10 min para la unión de los cebadores y, posteriormente, 50 min a 42 °C para la síntesis de cDNA.
5. Finalmente para inactivar el enzima y parar la reacción se sometió a la mezcla a 65 °C durante 10 min.

### 2.15.2 Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa. RT- qPCR

La amplificación de los fragmentos de cDNA para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero se realizó utilizando Platinum Taq ADN polimerasa de invitrogen. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador IQ de BIORAD. La mezcla para la reacción contenía: 1 µg de ARN reverso transcrito (cDNA), 0.2 µM de los primers específicos del gen a estudiar, 0.2 mM de mezcla de dNTPs, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, solución de SYBR Green I 0.1x platinum Taq ADN polimerasa (1-2.5 U). El programa estándar de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, precedido de 35 ciclos de amplificación y cuantificación de 30 seg a 95 °C, 45 seg, a 55 °C y 45 seg a 72 °C. A continuación se llevaron a cabo 1 ciclo de 1 min a 95 °C, otro ciclo de 1 min a 70 °C y 90 ciclos de 10 seg a 55 °C. Terminada la reacción se realizó un análisis de la curva de Melting o curva de fusión para la determinación de la formación de productos



específicos. En la tabla 3.5 se pueden observar los *primers* utilizados en RT-qPCR en este trabajo.

**Tabla 5.** Cebadores empleados en RT-qPCR

Gen	Forward Primer (5' a 3')	Reverse Primer (5' a 3')
<i>smc03224 (16S)</i>	TCTACGGAATAACGCAGG	GTGTCTCAGTCCCAATGT
<i>smc00033</i>	GTTGCGATCTGATGCAGG	GTTGCGATCTGATGCAGG
<i>smc01513 (hmuS)</i>	ACATCAAGCAAGGACACG	CACTTGTCGAAGAACTGC
<i>smc02085 (exbB)</i>	CTTCCGCATGATCTTTTCG	AGTTCCAGCGTCTTCACG
<i>smc02509 (sitA)</i>	GGTCTACAAGGCAAATGC	AACCACGTCGATCACCTT
<i>smc02885 (msrA1)</i>	TTCGGTATGGGCTGCTTC	TCGTCGTCTCCTGATAGG
<i>smc03168 (emrA)</i>	TCAAGGAGACGCAGATCG	CAGCGAGAAGACCGAACC
<i>smc03169(emrR)</i>	AAACGGGAGCGGATTCTC	GTGAACAGGTCTTCCTTG
<i>sma0855 (nodP1)</i>	GTTGCGACATTCTCCAATCC	GGTATCTACATGCAGGAATG
<i>sma0870 (nodD1)</i>	CTGCACATTCAGCTTTCC	TCCACGATCCTCGCAAAG
<i>sma0933 (traC)</i>	CCAGATCGAAAAGCTGCG	TCAAGCTCCTCCTCAGTG
<i>sma2402 (rhbB)</i>	TGAACATCAACGTCGCTG	GGAGTAGAGACTGCTTGC
<i>sma2414 (rhtA)</i>	CATCATCACGAAGAAGGG	TCGCTGTTATAGGTGACC
<i>smb20347</i>	CGAGAAACATATCAGCCG	TGACAAAGGGTGACGAGG
<i>smb21176 (phoD)</i>	ACTTCAAGCACGAGGTTCC	CAAAGCTCGAAGACCTGA

### 3. Ensayos con plantas

#### 3.1. Esterilización y germinación de semillas de alfalfa

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa* L, cultivar Aragón) se esterilizaron en superficie de acuerdo al siguiente protocolo descrito por (Olivares *et al.*, 1980):

1. Sumergir las semillas de alfalfa, en HgCl<sub>2</sub> al 2.5% durante 9 min y medio.
2. Lavar 5-6 veces con abundante agua desionizada estéril. Dejar en imbibición durante 2 horas.
3. Lavar 2-3 veces con abundante agua desionizada estéril.
4. Colocarlas las semillas bien separadas y en condiciones asépticas en placas Petri que contienen papel de filtro humedecido con agua desionizada estéril.
5. Germinar en oscuridad a 28°C durante aproximadamente 24 horas.

#### 3.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas

Se ha empleado la solución mineral libre de nitrógeno descrita por Rigaud and Puppo (1975), cuya composición se describe a continuación:

Macroelementos (por litro de agua):

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 68 mg

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 44 mg

$\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 123 mg

$\text{K}_2\text{SO}_4$ , 174 mg

$\text{SO}_4\text{Ca}$ , 173 mg

Ácido ethilendiaminotetraacético hierro (III) sal de sodio (EDTA iron (III) sodium salt), 25 mg

Microelementos (por litro de agua):

$\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,11 mg

$\text{BO}_3\text{H}_3$ , 2,85 mg

$\text{SO}_4\text{Mn}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , 0,37 mg

$\text{SO}_4\text{Zn}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,55 mg

$\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 mg.

El pH de la solución se ajustó a 7.5. La solución se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min.

### 3.3 Cultivo axénico de plantas

El cultivo axénico de plantas de alfalfa se realizó según la técnica descrita por Olivares y colaboradores (1980). Cuando las plántulas recién germinadas alcanzaron 1-2 cm de longitud, se colocaron en condiciones asépticas en tubos de 20x200 mm conteniendo 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. Se dejaron los tubos con las plantas en oscuridad durante dos días. Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, los tubos se cubrieron en su mitad inferior con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas, mantenida en las siguientes condiciones:

500  $\mu\text{einsteins}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (longitud de onda: 400-700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, 24/17°C de temperatura día/noche y 50% de humedad relativa.

### 3.4 Medida del grado de infectividad

Cuando las plantas tienen entre 9 y 10 días, se inoculan con 1 ml de una suspensión celular de aprox.  $10^6$  células/ml de la cepa en estudio. Al menos 20 plantas individuales (1 planta/tubo) se inoculan con cada cepa. Tras la inoculación se registró diariamente el número de plantas noduladas y el número de nódulos formados en cada planta. Se consideró que una planta estaba nodulada cuando en sus raíces existía al menos un nódulo visible. El seguimiento de la nodulación se continuó hasta que todas las plantas

estuvieron noduladas. La infectividad de la cepa se considera en función del tiempo de nodulación y del número de nódulos que forma.

### 3.5 Medida del grado de competitividad

La determinación del número de nódulos que una cepa es capaz de formar en presencia de otra se hizo utilizando cepas marcadas con el gen informador *gusA* ( $\beta$ -glucuronidasa). El comportamiento en competitividad de los transposantes tuvo que ser evaluado comparando los derivados de los mutantes *fadD* frente a las cepas silvestres Rm1021 ó GR4. Por alguna razón, tanto en 1021FDCSS como en GR4FDCSS, el pGUS3 se perdía imposibilitando marcar las cepas. Para solventar este problema en cada experimento además de incluir como control 12 plantas inoculadas con una mezcla 1:1 de Rm1021 y 1021(pGUS3) o GR4 y GR4(pGUS3) se incluyeron 12 plantas inoculadas con una mezcla de 1021FDCSS y 1021(pGUS3) o GR4FDCSS y GR4(pGUS3). Se observó que la cantidad de nódulos colonizados bien por 1021FDCSS o por GR4FDCSS, era similar al número de nódulos colonizados por las cepas silvestres; permitiéndonos comparar el porcentaje de ocupación de nódulos de la cepa parental frente a la cepa en estudio.

El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera. Cuando las plantas tienen entre 9 y 10 días, se inoculan al menos 12 plantas individuales (1 planta/tubo) con una mezcla 1:1 de la cepa a estudiar derivada de 1021FDCSS con 1021(pGUS3) o derivada de GR4FDCSS con GR4(pGUS3). 15 días después de la inoculación se cortaron las raíces, se aclararon con agua destilada entre 10-15 minutos y se mantuvieron sumergidas en 5mL de una solución de X-Gluc (21mg/40mL) en tampón fosfato sódico 50mM pH 7 y SDS al 1%, durante 14-16 horas a 37°C en oscuridad. Pasado este tiempo, los nódulos que contienen 1021(pGUS3) o GR4(pGUS3) o estaban ocupados por ambas cepas aparecieron teñidos de azul, mientras que aquellos ocupados exclusivamente por la cepa de interés permanecieron blancos. Se pudo establecer así la relación entre la capacidad de ocupación de los nódulos de la cepa de estudio y su parental con respecto a la 1021(pGUS3) o GR4(pGUS3), comparando el porcentaje de ocupación de la cepa parental (1021FDCSS o GR4FDCSS) en la mezcla control con el de la cepa de estudio (Derivada de 1021FDCSS o GR4FDCSS) en la mezcla problema.

#### 4. Técnicas analíticas

##### 4.1 Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa en cultivos celulares

La determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa se llevó a cabo en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (1972). Este método se basa en una reacción colorimétrica en la que el o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, al ser hidrolizado por ésta, produce galactosa y o-nitrofenol. Este último compuesto es de color amarillo y su intensidad puede medirse por espectrofotometría.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue determinada en cepas que contenían fusiones de la región génica de interés (operón *nod*) con el gen informador *lacZ* siguiendo la metodología descrita por Sambrook *et al.*, 1989. Las cepas de estudio se cultivaron en medio rico (TY) con los antibióticos correspondientes hasta alcanzar la fase exponencial. Posteriormente fueron lavados dos veces con MM líquido y se procedió de dos formas distintas:

- a) Se inocularon 30 y 60  $\mu$ l de cada una de las cepas a ensayar en 3 ml de MM líquido conteniendo metanol (compuesto control) y luteolina a una concentración de 5  $\mu$ M. Se incubaron en agitación a 28°C ON hasta alcanzar una  $DO_{600}$  comprendida entre 0.2-0.4.
- b) Una vez lavados los cultivos con medio mínimo, se ha concentrado y se ha realizado ensayo de movilidad en superficie en placas de MM semisólido, tal y como se describe en el apartado 1.6 de esta sección, añadiendo al medio metanol o luteolina a una concentración final de 5  $\mu$ M. Se han dejado incubar las placas a 28°C durante 19 horas y se ha procedido a lavar cada una de ellas con 2ml de MM líquido para recoger las células. Posteriormente se ha midió la  $DO_{600}$  de estas células, quedando ésta comprendida entre 0.2-0.4.

Se tomaron 100  $\mu$ l de las cultivos celulares (obtenidos en a y b) y se procedió a su la lisis celular. Para ello se les añadió 900  $\mu$ l de tampón Z ( $Na_2HPO_4 \times 12 H_2O$  (0.06 M),  $Na_2HPO_4 \times H_2O$  (0.04 M), KCl (0.01 M),  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (0.001 M),  $\beta$ -mercaptoetanol (0.05 M)), 20  $\mu$ l de cloroformo y 5  $\mu$ l de 0.1% SDS. La mezcla se agitó diez segundos con vórtex y se incubó 10 minutos a 28°C. La actividad  $\beta$ -galactosidasa comenzó tras añadir 200  $\mu$ l de una solución 4mg/ml del sustrato ONPG en tampón Z.

La incubación de los extractos enzimáticos con el sustrato se hizo a 28°C prolongándose hasta la aparición de una coloración amarilla suficientemente

intensa y estable. La reacción se detuvo por la adición de 500 µl de una solución 1 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Se anotó el tiempo transcurrido desde la adición de ONPG y se separaron los restos celulares por centrifugación durante 3 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante se recogió en un tubo y se determinó la absorbancia a 420 nm, sustrayendo en las muestras problema el valor obtenido para el control.

La actividad β-galactosidasa se expresó en unidades Miller (U) calculada mediante la siguiente fórmula:

$$U=1000x \frac{A_{420}}{t \times V \times A_{600}}$$

Donde A<sub>420</sub> y A<sub>600</sub> son los valores de D.O. obtenidos a la longitud de onda de 420 y 600 nm respectivamente. El valor t corresponde al tiempo de incubación en minutos, mientras que V es el volumen de cultivo utilizado en ml.

## **5. Técnicas microscópicas**

Para la visualización al microscopio electrónico de transmisión se realizó el ensayo *swarming* como se especifica en la sección 1.6. A las 24 horas de incubación se procedió a la colocación de 25µl de agua bi-destilada en el borde de la colonia y se colocó la rejilla encima de la gota durante cinco minutos. Posteriormente se volvió a colocar la rejilla en otra gota de agua durante un minuto. Este paso se repitió una segunda vez. Posteriormente fue colocada encima de una gota de acetato de uranilo al 2% durante tres minutos y se dejó secar una hora, al término de ésta, se procedió a la visualización de las muestras en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011.



# **CAPÍTULO I**





## **1. Identificación de determinantes genéticos implicados en la movilidad en superficie mostrada por mutantes *fadD* de *S. meliloti* GR4 y Rm1021.**

### **1.1 Obtención y selección de mutantes de *S. meliloti* afectados en movilidad mediante mutagénesis al azar.**

En el momento de iniciar este trabajo, la movilidad *swarming* en sentido estricto, sólo se había descrito en *S. meliloti* asociada a un mutante *fadD* de la cepa GR4 tras crecimiento en medio mínimo (MM) semisólido (Soto *et al.*, 2002). Bajo las mismas condiciones, la cepa silvestre GR4 nunca había mostrado este tipo de movilidad en superficie. Sin embargo, no todas las cepas silvestres de *S. meliloti* tenían este comportamiento. Estudios realizados en nuestro grupo habían puesto de manifiesto que las cepas Rm1021 y Rm2011, muy relacionadas entre sí y comúnmente utilizadas por distintos laboratorios, sí eran capaces de desplazarse sobre la superficie de medios semisólidos con elevada frecuencia, lo que sugería que el control de este tipo de movilidad era distinto entre las cepas GR4 y Rm1021/Rm2011 (Nogales *et al.*, 2010). No obstante, se había demostrado que independientemente del fondo genético, una mutación por pérdida de función en el gen *fadD* promovía el desplazamiento en superficie. Por ello, y con el objetivo de identificar determinantes genéticos implicados en este tipo de movilidad, se decidió obtener y caracterizar mutantes alterados en este tipo de translocación, derivados de fondos *fadD* de las cepas GR4 y Rm1021 de *S. meliloti*.

Para ello, las cepas GR4FDCSS y 1021FDCSS derivadas de GR4 y Rm1021, respectivamente, en las que el gen *fadD* se encuentra interrumpido por un cassette de resistencia a Sm/Spc (Amaya-Gómez, 2009; Nogales *et al.*, 2010), se sometieron a mutagénesis generalizada con Tn5 utilizando el plásmido pSUP2021, tal y como se describe en la sección Materiales y Métodos. Previamente se había comprobado que GR4FDCSS y 1021FDCSS presentaban el mismo fenotipo de movilidad *swarming* y *swimming* que el mutante *fadD* original derivado de GR4 descrito por Soto y colaboradores (2002). Los correspondientes transposantes seleccionados en MM sólido conteniendo los antibióticos Sm, Spc y Km, se sometieron a un escrutinio inicial, mediante picadura en medio inductor de movilidad en superficie (MM conteniendo 0.6% agar Pronadisa). Sólo aquellos clones que mostraron un fenotipo de movilidad

alterado con respecto al de la correspondiente cepa parental después de picar tres veces, se sometieron a un análisis fenotípico más detallado.

Los transposantes que, o bien mostraron una reducción o bien carencia total de movilidad en superficie con respecto a su correspondiente cepa parental, se denominaron NS (de “no swarming”) o GNS, dependiendo de que fueran derivados de 1021FDCSS o GR4FDCSS, respectivamente. Por otro lado, los transposantes que mostraron mayor translocación en superficie que la cepa parental se denominaron SPS (de “super-swarming”) o GSPS según fueran derivados de 1021FDCSS o GR4FDCSS, respectivamente. Los distintos transposantes seleccionados en este estudio junto con sus características más relevantes descifradas tras la correspondiente caracterización genética y fenotípica se describen en la Tabla 1.

De 5820 transposantes 1021FDCSS::Tn5 analizados se identificaron nueve que presentaron una translocación en superficie alterada: siete de ellos (NS26, NS30, NS33, NS302, NS320, NS321, NS2.9) mostraron una movilidad en superficie disminuida en comparación con la mostrada por la cepa parental (1021FDCSS), mientras que otros dos mutantes (SPS1 y SPS324) presentaron mayor translocación en superficie.

Por otro lado, de 4000 transposantes GR4FDCSS::Tn5 analizados, se identificaron 10 mutantes que presentaron algún tipo de alteración en el desplazamiento en superficie: en ocho de ellos (GNS5, GNS38, GNS43, GNS52, GNS53, GNS55, GNS62 y GNS76) no pudo detectarse translocación en superficie, en el transposante GNS61 la movilidad se encontraba notablemente disminuida, mientras que el transposante GSPS51 mostró mayor desplazamiento en superficie que la cepa parental GR4FDCSS.

## **1.2 Caracterización genética de los mutantes alterados en movilidad.**

Con el fin de conocer el número de inserciones del Tn5 presentes en los transposantes seleccionados y asegurar que las alteraciones observadas en movilidad eran debidas a una única inserción del transposón, se llevaron a cabo hibridaciones del ADN genómico de cada uno de los mutantes con una sonda específica del Tn5 (ver anexos 1).

Dichos experimentos de hibridación revelaron que todos los transposantes seleccionados contenían una sola inserción del transposón (anexo 1, figura A1.1). Además, el análisis de las bandas de hibridación junto con el fenotipo

de movilidad mostrado, indicaban que los mutantes NS30, NS320 y NS321 probablemente correspondían a clones del mismo transposante derivado de 1021FDCSS, al igual que los mutantes GNS52 y GNS53 que también parecían ser clones idénticos entre sí (Anexos 1, figura A1.1). Por ello, para la posterior caracterización genética sólo se continuó trabajando con NS320 y GNS53 como representantes de cada mutación.

La identificación del gen afectado por la inserción del transposón en cada mutante se llevó a cabo bien mediante clonaje del fragmento de ADN genómico que contenía el Tn5 y posterior secuenciación de las secuencias adyacentes o bien utilizando el método de PCR arbitraria. El detalle de este proceso se explica en Anexos apartado 1.1.

a) Transposantes derivados de 1021FDCSS.

Como se muestra en la Tabla resumen 1, los transposantes derivados de 1021FDCSS resultaron estar afectados en distintos genes flagelares (*flgG*, *flgI*, *flgH*), de motilidad (*motC*), y quimiotaxis (*cheA*), pero también en genes que aparentemente no están relacionados con movilidad bacteriana como el gen *sodB* y *exoX*.

En el transposante NS26 el Tn5 interrumpió la secuencia del gen *flgG* (*smc03030*), que teóricamente codifica una proteína de 262 aa que formaría parte del eje del cuerpo basal del flagelo. La inserción del transposón se localizó exactamente interrumpiendo el codón para el aa<sub>153</sub>. No obstante, no se puede descartar un efecto polar sobre los genes *flgA-flgI-motE-flgH-fliL-fliP* localizados aguas abajo, que podrían formar parte del mismo operón y que codifican proteínas constituyentes de distintas estructuras del cuerpo basal del flagelo, la chaperona de MotC (MotE), o uno de los componentes del sistema de secreción tipo III (T3SS) flagelar (FliP). En otros dos de los mutantes seleccionados, el Tn5 también interrumpió genes de este teórico operón. Éste fue el caso de los mutantes NS2.9 y NS320 en los que el transposón se localizó en los genes *flgI* (*smc03032*) y *flgH* (*smc03034*), respectivamente. Concretamente, el transposón se encontraba interrumpiendo el codón para el aminoácido 243 de la proteína FlgI (371 aa) en el caso del NS2.9 y el codón para el aminoácido 142 de la proteína FlgH (236 aa), en el caso del NS320. Estos genes codifican proteínas del anillo P y del anillo-L del cuerpo basal del flagelo. Al igual que en el caso del mutante NS26, no se

puede descartar un efecto polar de las inserciones del transposón sobre los genes localizados aguas abajo.

En el mutante NS302, el transposón interrumpió la secuencia codificante de *motC* (*smc03043*), concretamente el codón para el aminoácido 3. La proteína MotC de 434 aa está descrita como una proteína periplásmica cuya ausencia provoca parálisis en la bacteria. MotC interacciona con MotB para controlar el flujo de energía necesario para la rotación del flagelo (Eggenhofer *et al.*, 2004; Platzer *et al.*, 1997). Al igual que en los casos anteriores, podría existir un efecto polar sobre los genes *fliK-smc03045* que podrían formar parte de la misma unidad transcripcional en la que se encuentra *motC*.

En el mutante SPS324 el gen afectado fue *cheA* (*smc03007*), un gen de la clase III que forma parte de un operón con otros ocho genes implicados en quimiotaxis (Greck *et al.*, 1995). El Tn5 se encontró interrumpiendo el codón para el aminoácido 372. CheA (758 aa), es la histidín-quinasa del sistema de quimiotaxis que en *S. meliloti* fosforila a dos reguladores de respuesta CheY1 y CheY2 en respuesta a la detección de señales químicas por receptores MCP (*Methyl-accepting Chemotaxis Protein*) (Schmitt, 2002). CheY2 en su forma fosforilada (activa) interacciona con el motor flagelar, provocando una reducción en la velocidad de rotación del flagelo. Al igual que en los casos anteriores no podemos descartar que el fenotipo sea exclusivamente debido a un defecto en *cheA*, ya que este gen pertenece al operón *icpA-smc03005-cheA-cheW1-cheR-cheB1-cheY2-cheD-smc03013*, y el transposón ha podido generar un efecto polar en genes localizados aguas abajo.

En el mutante NS33, el gen interrumpido por el transposón fue *sodB* (*smc00043*) que codifica una superóxido dismutasa (SOD) dependiente de hierro y manganeso. Se trata de un enzima antioxidante que cataliza la conversión del radical superóxido en peróxido de hidrógeno. En este mutante, la inserción del Tn5 afectaría solamente a los últimos 6-7 aminoácidos de la proteína (200 aa). Además, en este caso se descarta la generación de efectos polares ya que aguas abajo a la inserción nos encontramos un gen (*smc00107*) cuya transcripción tiene lugar en sentido contrario a la del gen *sodB*.

El mutante SPS1 caracterizado por mostrar una apariencia mucosa y ser capaz de moverse en superficie más eficientemente que la cepa parental resultó estar afectado en el gen *smb20947* (*exoX*). Concretamente el

transposón se encontraba interrumpiendo el codón que codifica el aminoácido 34 de una proteína pequeña de 98 aminoácidos que funciona como represor de la síntesis de EPS mediante un mecanismo de regulación post-transcripcional (Müller *et al.*, 1993). Aunque se ha descrito que mutaciones en este gen causan la súper-producción de EPS en diferentes rizobios (Skorupska *et al.*, 2006), no está claro si ExoX regula la cantidad de EPS I, el grado de polimerización del mismo o su localización (Reed *et al.*, 1991).

b) Transposantes derivados de GR4FDCSS.

El análisis de la secuencia afectada en los distintos mutantes derivados de GR4FDCSS afectados en translocación en superficie, reveló la implicación de genes del regulón flagelar (*visN*, *visR*, *flgK*, *flgC*, *flhA*), un gen que forma parte de un sistema regulador de tres componentes implicado en control de movilidad y producción de exopolisacáridos (*emma*) y un gen de función desconocida (*smc00525*). Mediante el análisis de la secuencia pudimos descartar otro transposante de nuestro estudio, ya que, aunque en posiciones distintas, en los mutantes GNS38 y GNS53 el transposón se encontraba afectando al gen *visR*, por lo que decidimos continuar tan sólo con uno de ellos (GNS53). De igual forma, comprobamos que en los mutantes GNS43 y GNS62, el transposón había afectado en ambos casos el gen *flgC*, por lo que sólo procederemos a la descripción del mutante GNS43.

En GNS5, la inserción afecta al gen *flgK* (*smc03048*) (interrumpe el codón para el aminoácido 341 de la proteína) y con probable efecto polar sobre al menos el gen *flgL* localizado aguas abajo. Ambos genes *flgK* y *flgL* codifican proteínas de 472 y 345 aas respectivamente, que forman parte de la región que une el gancho al filamento flagelar. El mutante GNS43 se halla afectado en *flgC* (*smc03028*), con el Tn5 interrumpiendo el codón para el aminoácido 18 de una proteína de 139 aas del eje del cuerpo basal del flagelo mientras que en el mutante GNS55, la inserción del transposón ocurrió en la zona intergénica entre el gen *fliQ* y *flhA*, por lo que probablemente la expresión del teórico operón formado por los genes *flhA-fliR-smc03056*, se encuentre alterada con el correspondiente efecto sobre el T3SS del flagelo. Por último, dos de los mutantes de este grupo (GNS76 y GNS53) se vieron afectados en los genes de la clase IA del regulón flagelar, los genes *visN* (*smc03015*) y *visR* (*smc03016*) respectivamente. En el primero, la inserción del Tn5 tuvo lugar en el codón

que codifica para el aminoácido 108 de la proteína VisN (245 aas), mientras que en el caso del GNS53 ocurrió en el codón que codifica para el aminoácido 148 de VisR (246 aas). En *S. meliloti*, *visN* y *visR* codifican proteínas del tipo LuxR que forman un heterómero VisNR que tras la unión de un efector de naturaleza desconocida, actúa como regulador maestro del regulón flagelar. Se sabe que mutaciones en estos genes, resultan en la pérdida de la expresión de todos los genes del regulón flagelar (Sourjik *et al.*, 2000; Sourjik *et al.*, 1998).

El derivado de GR4FDCSS, GNS61 de apariencia mucosa se halla afectado en el gen *smb21521* (*emma*). Se ha descrito que el gen *emma* codifica una proteína de 152 aas que forma parte de un sistema de tres componentes, implicadas en producción de polisacáridos, movilidad y respuesta de membrana a estrés (Morris and González, 2009).

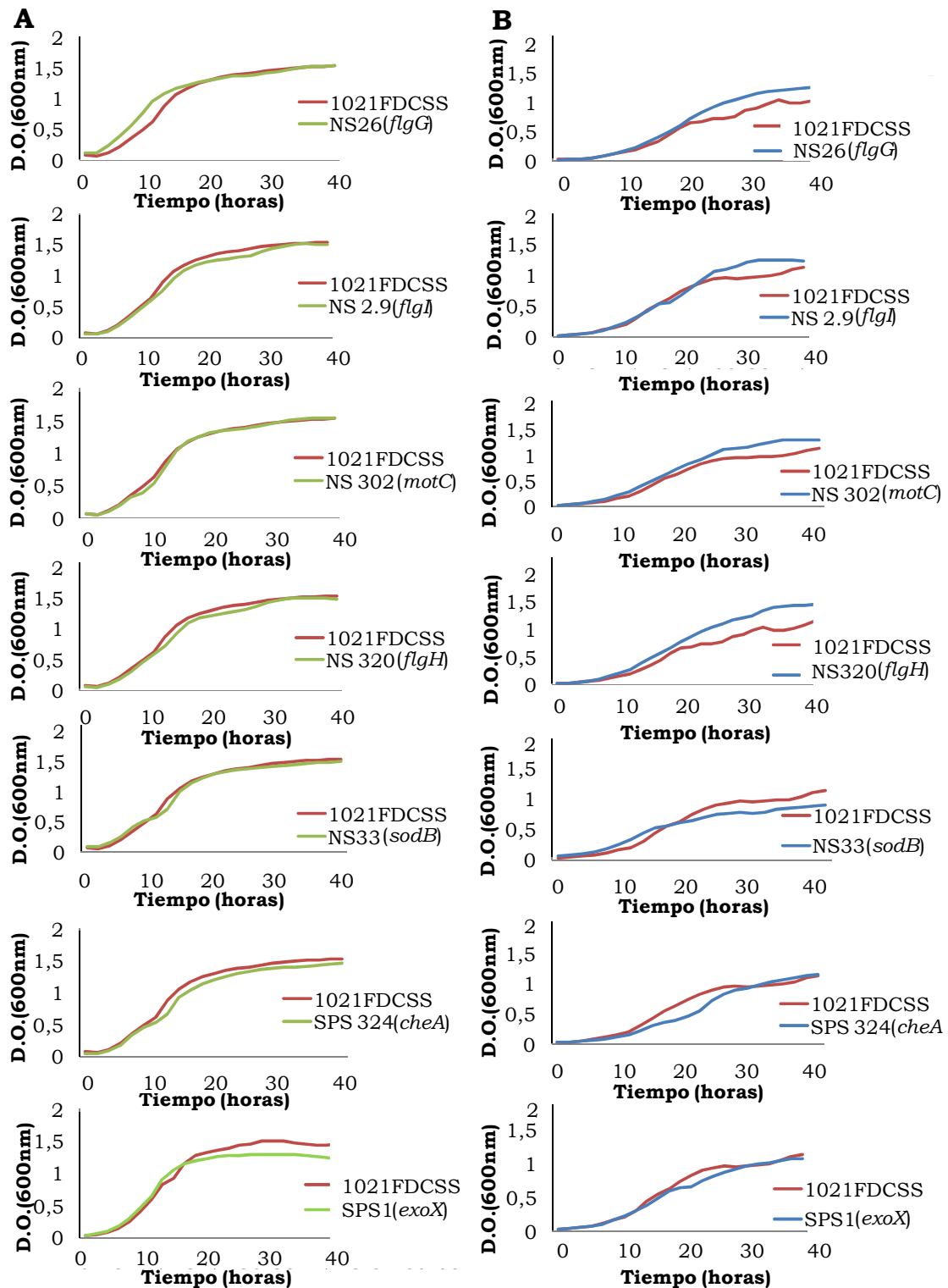
En el mutante “hiperswarmer” GSPS51 la inserción afectó a un gen (codón para el aa 869) que codifica una proteína de 1138 aminoácidos anotada como una hipotética proteína transmembrana de *S. meliloti*, con posible función quinasa pero de la que no existe más información en la bibliografía.

### **1.3 Caracterización fenotípica de los mutantes alterados en movilidad.**

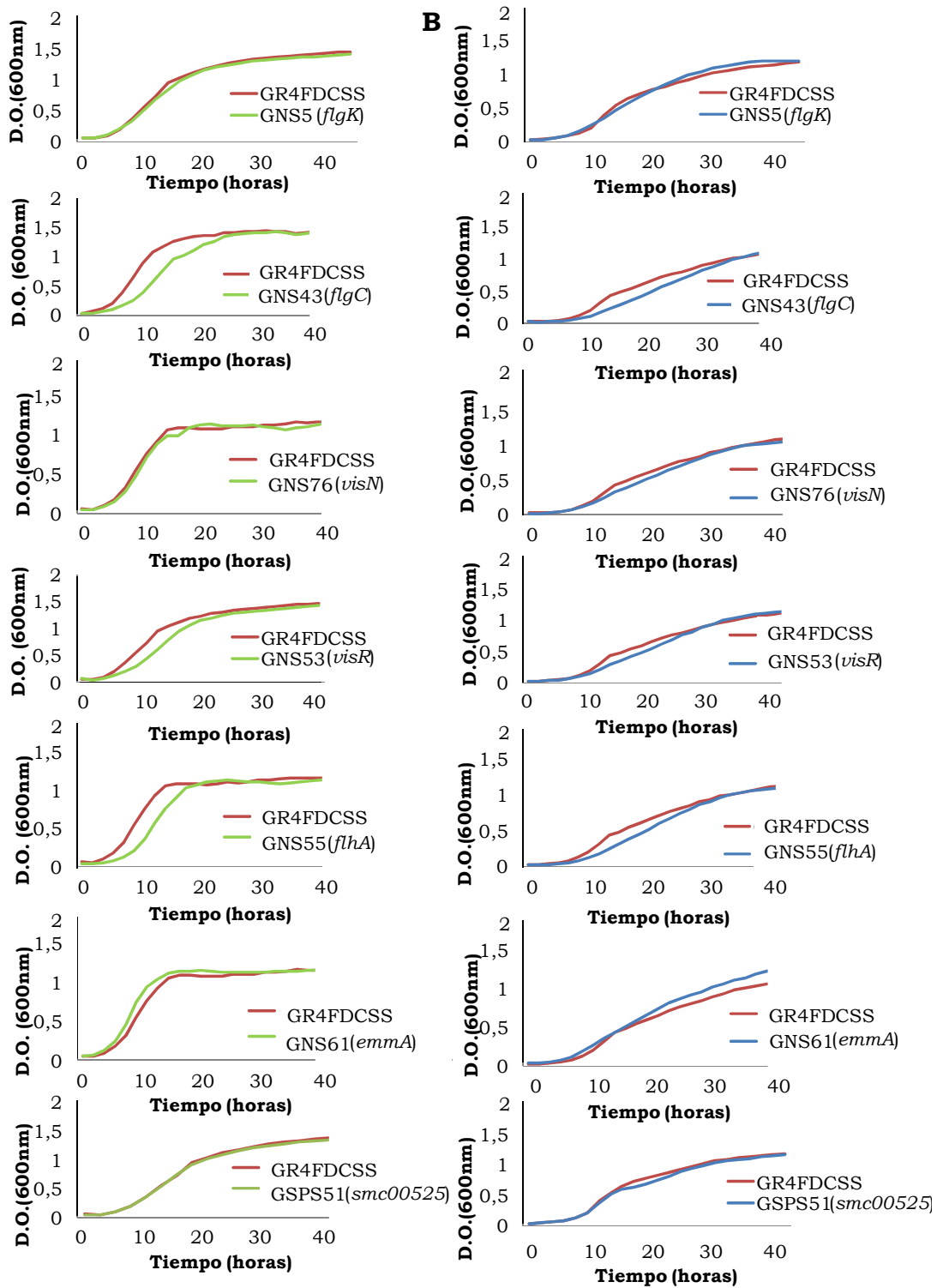
#### **1.3.1. Crecimiento**

Con objeto de comprobar si las variaciones en movilidad mostradas por los distintos transposantes seleccionados pudieran ser consecuencia de alteraciones en crecimiento, se compararon las curvas de crecimiento en medio líquido de cada uno de ellos y la correspondiente cepa parental (1021FDCSS o GR4FDCSS) tanto en un medio rico (TY) como en medio mínimo (MM).

En ningún caso se apreciaron diferencias significativas en el crecimiento (figuras 1 y 2).



**Figura 1.** Curvas de crecimiento (realizadas en Bioscreen) en (A) medio rico TY y en (B) medio mínimo (MM) de distintos transposantes junto con su correspondiente cepa parental, 1021FDCSS.



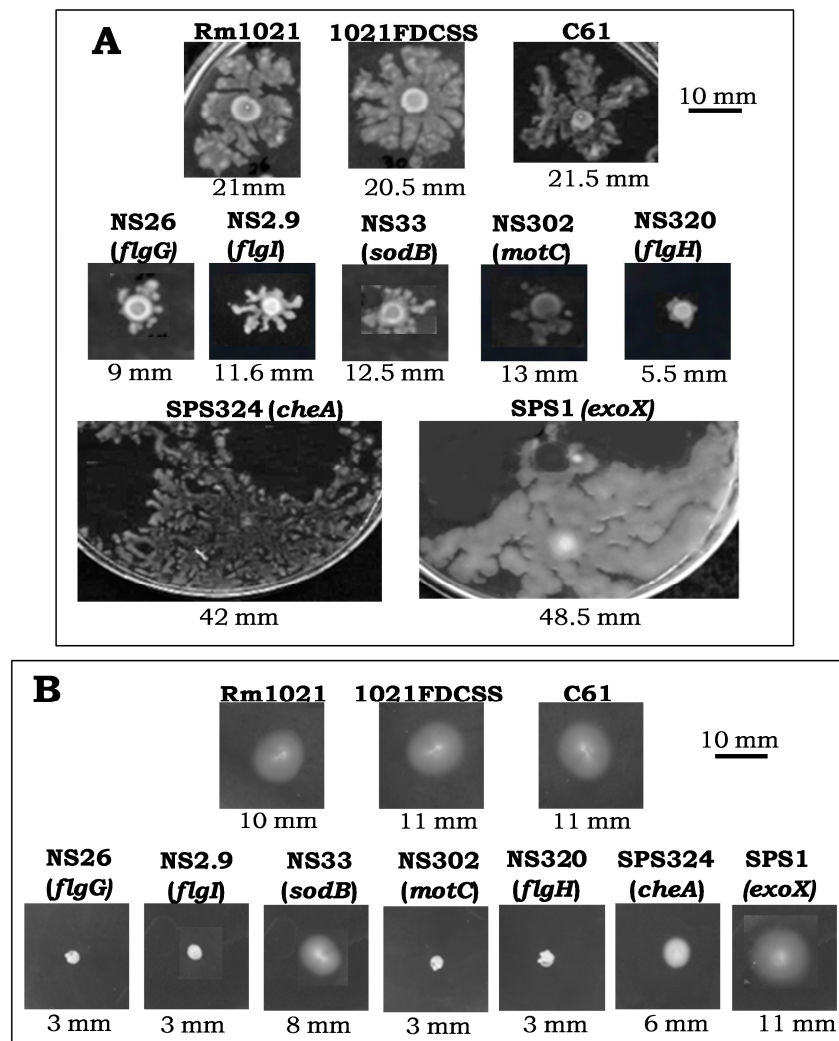
**Figura 2.** Curvas de crecimiento (realizadas en Bioscreen) en (A) medio rico TY y en (B) medio mínimo (MM) de distintos transposantes junto con su correspondiente cepa parental, GR4FDCSS.



**1.3.2. Movilidad**

Los ensayos de movilidad en superficie realizados con el protocolo estándar confirmaron lo observado en el escrutinio inicial llevado a cabo con picadura tanto en los transposantes derivados de 1021FDCSS (figura 3) como en los derivados de GR4FDCSS (figura 4).

En este estudio se han incluido dos transposantes control, C61 y GC60 derivados de 1021FDCSS y GR4FDCSS respectivamente, con objeto de comprobar que la inserción del Tn5 por sí sola no generaba ninguna alteración en movilidad.



**Figura 3.** Ensayos de (A) movilidad en superficie y (B) movilidad *swimming* de los transposantes 1021FDCSS::Tn5. Se indica la media de dispersión de cada colonia determinada como la media de la longitud de cada uno de los lados del teórico rectángulo que las engloba, o del diámetro medio para el *swimming*, en milímetros (mm) de un único experimento. C61, es un transposante control derivado de *S. meliloti* 1021FDCSS que no muestra defectos ni en movilidad en superficie ni en *swimming*.

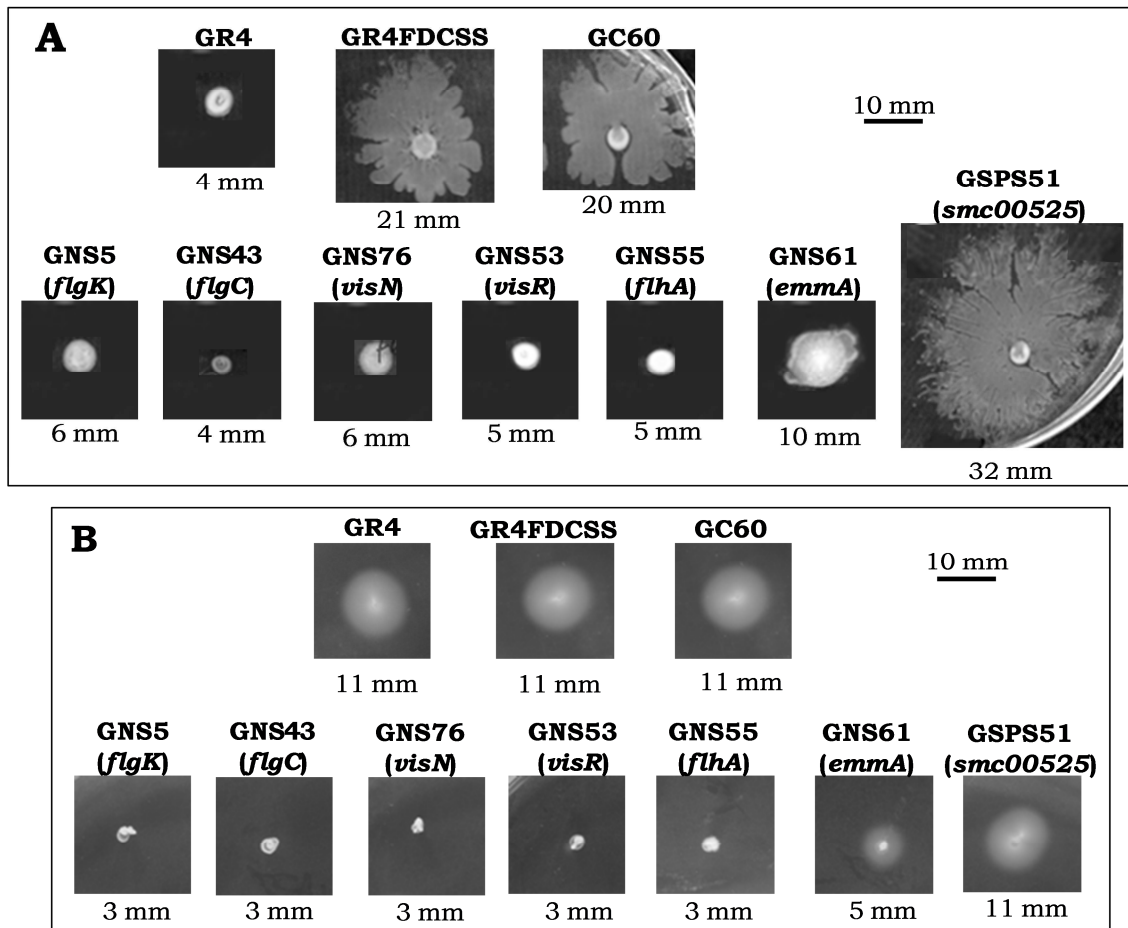
Un hecho que llama la atención de los mutantes NS26 (*flgG*), NS2.9 (*flgI*), NS302 (*motC*) y NS320 (*flgH*) derivados de 1021FDCSS es que aunque la movilidad tipo *swimming* se ve abolida por completo (figura 3B), consecuencia lógica de la ausencia del filamento flagelar o por encontrarse afectado en una proteína relacionada con motilidad (en el caso de NS302), sin embargo, y aunque lo hacen con menor intensidad que la cepa parental 1021FDCSS, siguen presentando desplazamiento en superficie (figura 3A). El movimiento en superficie mostrado por estos mutantes es independiente de la acción flagelar y por tanto no puede ser catalogado de movilidad *swarming*. Por otro lado, los dos mutantes con mayor translocación en superficie (SPS1 y SPS324), presentan distinto comportamiento *swimming*. En el primero, la capacidad natatoria era similar a la mostrada por 1021FDCSS, mientras que la de SPS324 era menor que la de ésta.

Igual que en el caso anterior, los ensayos de movilidad llevados a cabo con el protocolo estándar en los siete mutantes derivados de la mutateca GR4FDCSS::Tn5 confirmaron los resultados obtenidos en el *screening* inicial (figura 4).

En cinco de ellos tanto la movilidad en superficie como el *swimming* se vieron abolidos por completo (GNS5 (*flgK*), GNS43 (*flgC*), GNS76 (*visM*), GNS53 (*visR*) y GNS55 (*flhA*)). El transposante afectado en *emmA* (GNS61), sí presenta cierta movilidad en superficie y, aunque reducida, también posee movilidad *swimming*. Por último, el mutante GSPS51 (*smc00525*) con mayor translocación en superficie no presentaba alteración alguna en lo que a movilidad tipo *swimming* respecta.

#### **1.4 Visualización al microscopio electrónico de transmisión (TEM).**

Los distintos transposantes seleccionados se sometieron a observación en microscopio electrónico de transmisión (TEM) para comprobar si las alteraciones en movilidad podían ser explicadas por cambios en el número de flagelos o cualquier otro cambio morfológico. Para realizar estas observaciones, se tomaron células del borde de colonias crecidas en MM semisólido siguiendo el protocolo estándar de ensayo de movilidad en superficie y tras 20 horas de incubación.

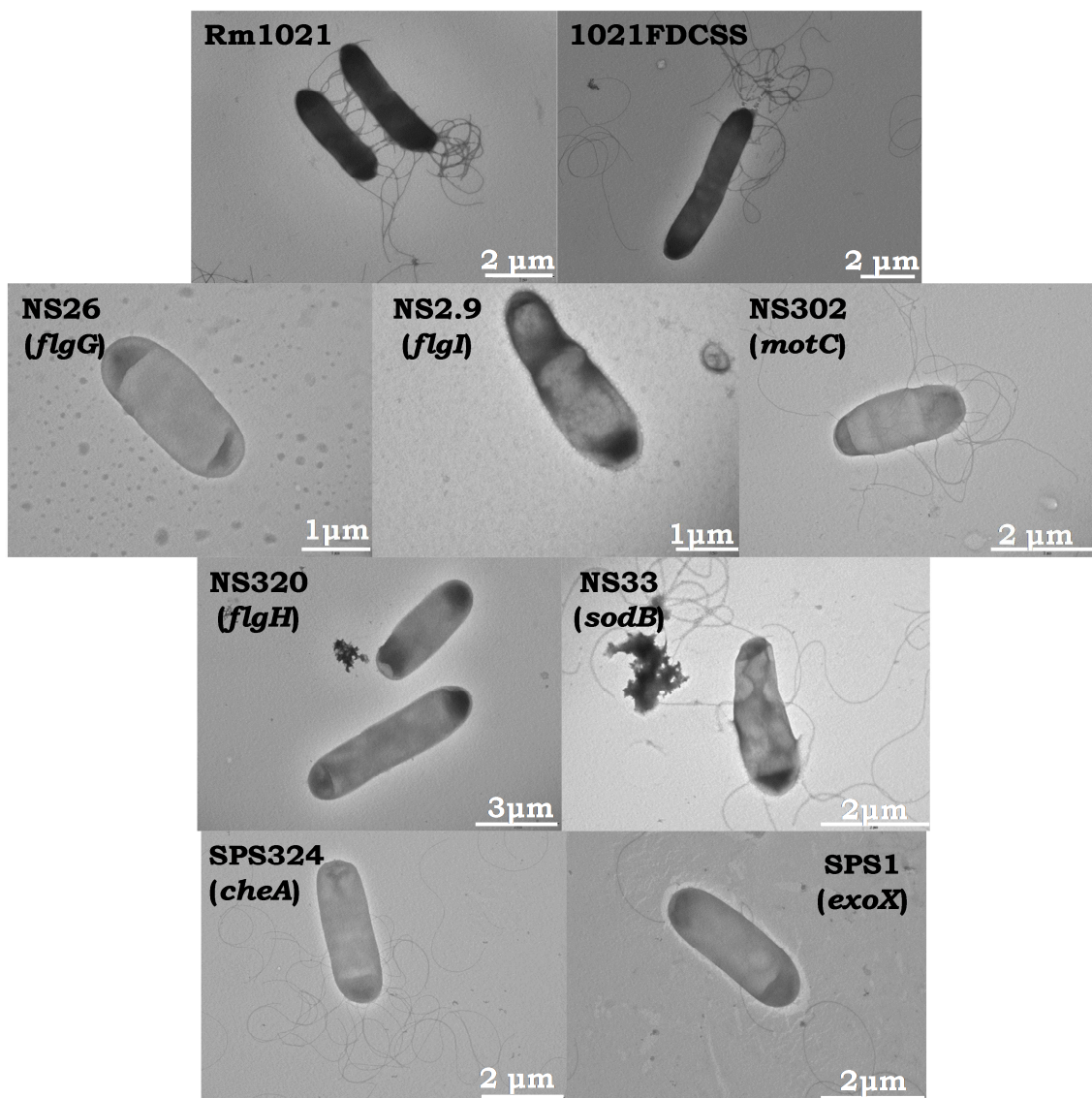


**Figura 4.** Ensayos de (A) movilidad en superficie y (B) movilidad *swimming* de los transposantes GR4FDCSS::Tn5. Se indica la media de dispersión de cada colonia determinada como la media de la longitud de cada uno de los lados del teórico rectángulo que las engloba, o del diámetro medio para el *swimming*, en milímetros (mm) de un único experimento. GC60, es un transposante control derivado de *S. meliloti* GR4FDCSS que no muestra defectos ni en movilidad en superficie ni en *swimming*.

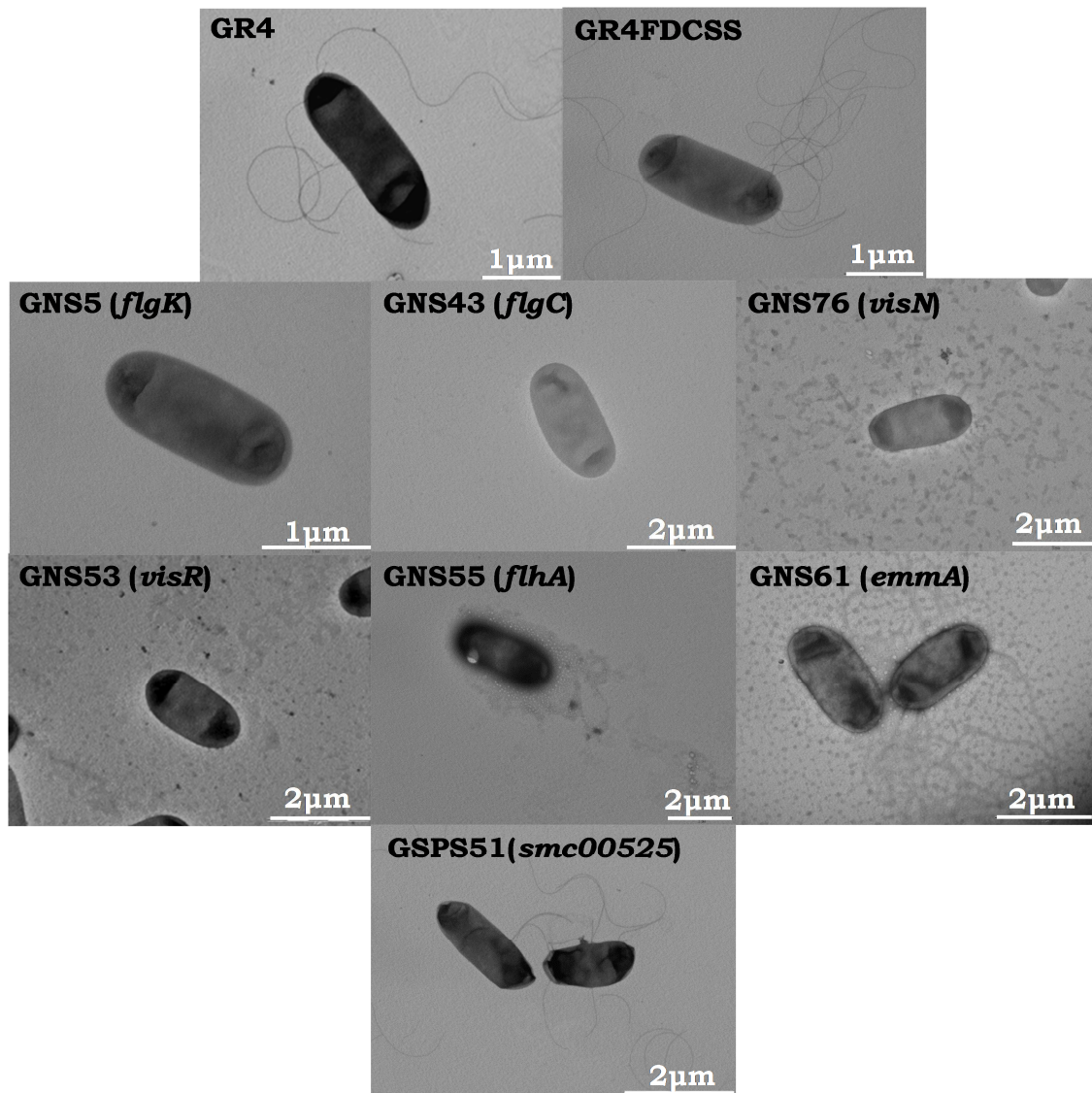
Como se puede apreciar en la figura 5, los transposantes derivados de 1021FDCSS afectados en los genes *flgG*, *flgI* y *flgH* (NS26, NS2.9 y NS320), carecen de flagelos, lo que explica el que no presenten movilidad tipo *swimming* y que muestren una sensible reducción en su capacidad de translocar en superficie. Sin embargo, el transposante NS302 (*motC*), presenta flagelos por lo que su fenotipo *swimming* negativo y su menor capacidad de translocar en superficie que la cepa parental probablemente sea debido a la parálisis del motor flagelar. El comportamiento en superficie de estos cuatro mutantes, pone en evidencia la existencia de un desplazamiento en superficie independiente de acción flagelar en el mutante *fadD* de Rm1021. Por último, los transposantes NS33 (*sodB*), SPS1 (*exoX*) y SPS324 (*cheA*) muestran flagelos que deben ser activos ya que los tres mutantes presentaron movilidad

*swimming*. En este estudio no hemos determinado si las mutaciones han originado cambios en el número o longitud de los flagelos en comparación con la cepa parental

Con respecto a los derivados de GR4FDCSS, la visualización microscópica nos ha permitido confirmar la ausencia total de flagelos en los transposantes GNS5, GNS43, GNS76, GNS53, GNS55, y GNS61 (afectados en los genes *flgK*, *flgC*, *visN*, *visR*, *flhA*, y *emma*, respectivamente) (fig. 6), de ahí su nula movilidad *swimming* y en superficie. El transposante GSPS51 (*smc00525*) fue el único transposante derivado de GR4FDCSS que presentó flagelos aunque no se han determinado alteraciones en número o longitud de los mismos.



**Figura 5.** Morfología obtenida en microscopio electrónico (TEM) de células de Rm1021, 1021FDCSS y distintos transposantes derivados del mutante *fadD*. Las células proceden del borde de una colonia crecida en MM semisólido tras 20 horas de incubación.



**Figura 6.** Morfología obtenida en microscopio electrónico (TEM) de células de GR4, GR4FDCSS y distintos transposantes derivados del mutante *fadD*. Las células proceden del borde de una colonia crecida en MM semisólido tras 20 horas de incubación.

### 1.5 Fenotipo simbiótico.

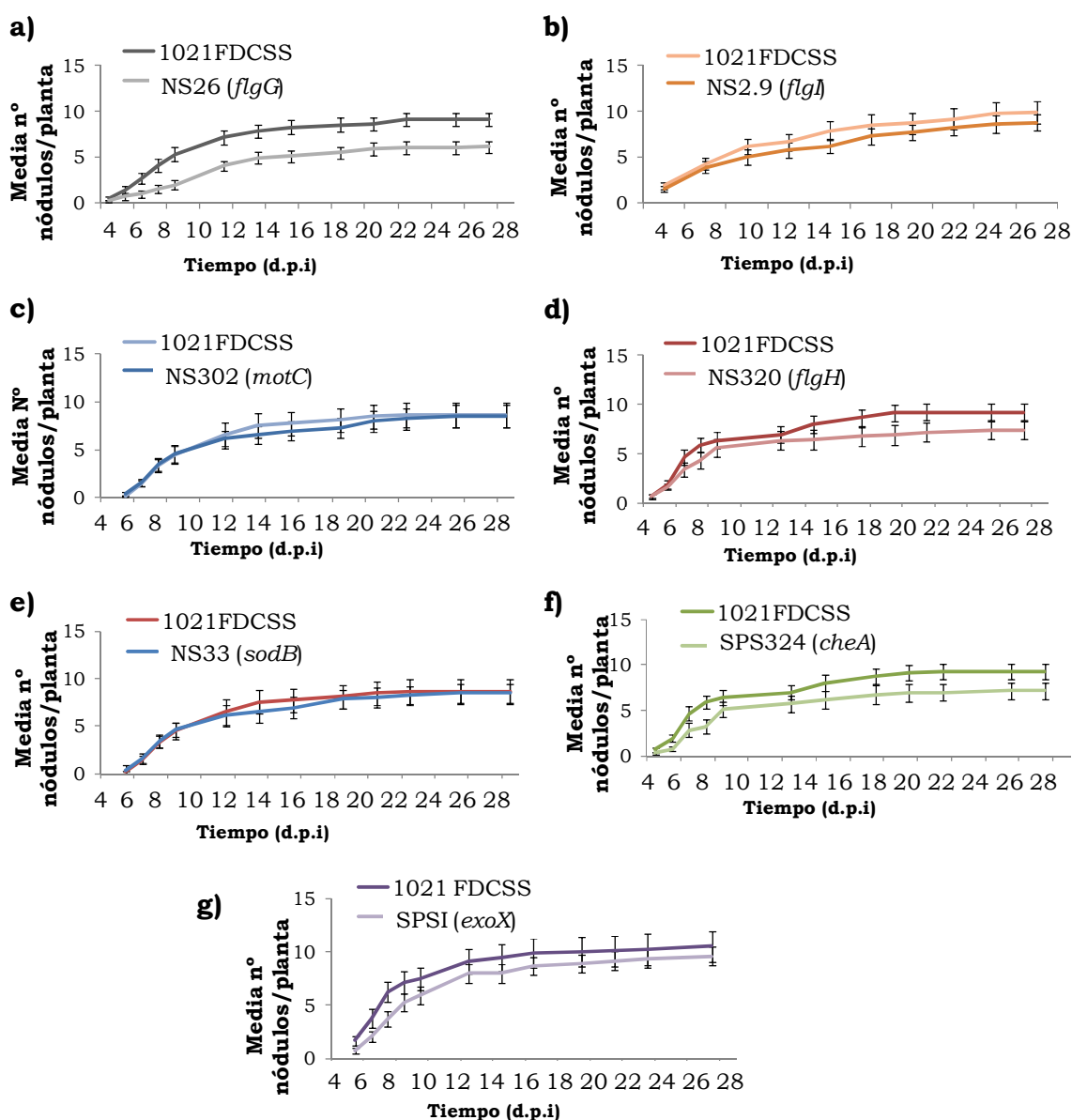
Como parte de la caracterización de los distintos transposantes, se analizó su fenotipo simbiótico. Además de comprobar si eran capaces de formar nódulos fijadores de N en plantas de alfalfa, analizamos su capacidad infectiva y competitiva comparándolas con las mostradas por sus correspondientes cepas parentales. Estos experimentos se realizaron creciendo las plantas de alfalfa en cultivo hidropónico.

El aspecto rosado de los nódulos, así como el desarrollo y verdor mostrado por las plantas de alfalfa inoculadas con cada uno de los transposantes, eran



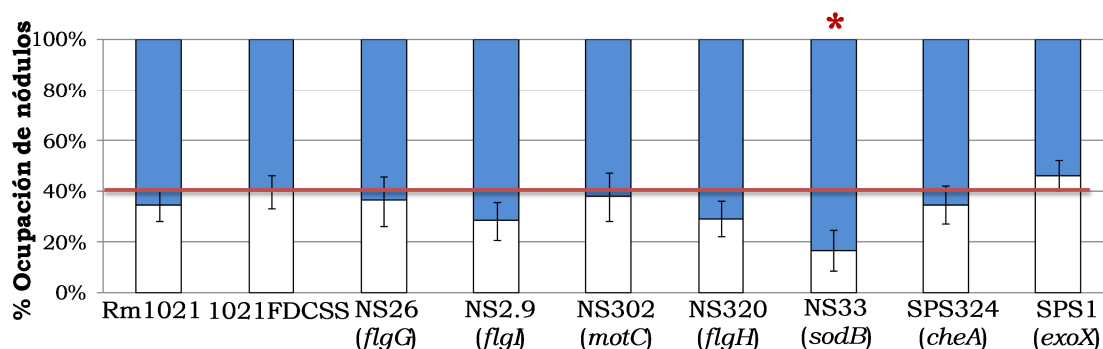
indicativos de que todos los mutantes son capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno. No obstante, se encontraron ciertas diferencias en eficiencia de formación de nódulos y capacidad competitiva.

En el caso de los transposantes derivados de 1021FDCSS, la mayoría de ellos tuvieron una eficiencia de formación de nódulos similar a la de la cepa parental (fig. 7), salvo en el caso de los mutantes NS26 y SPS324 afectados en los genes *flgG* y *cheA*, respectivamente que resultaron ser consistentemente menos infectivos que 1021FDCSS (figura 7a, y 7f). El fenotipo más acusado lo mostró el mutante NS26.



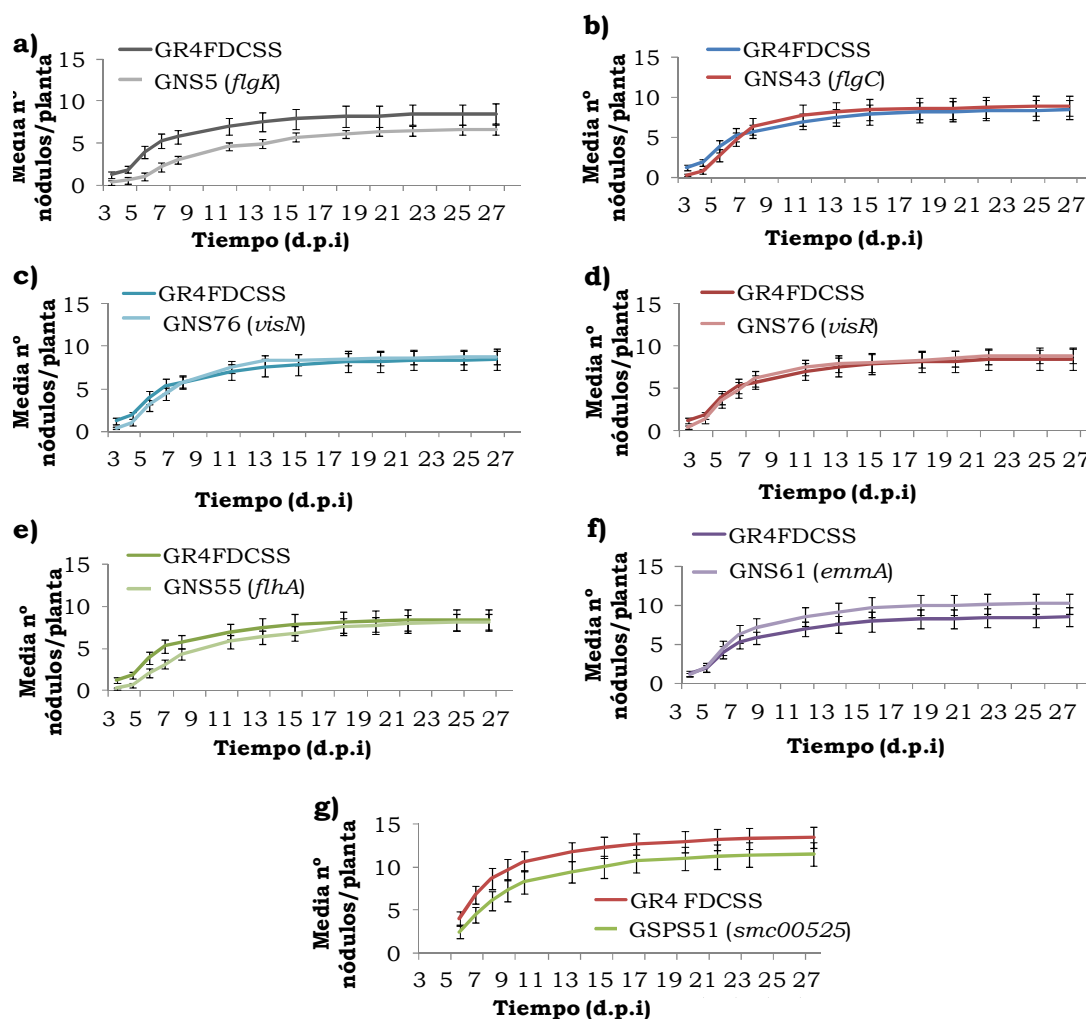
**Figura 7.** Eficiencia de nodulación en *M. sativa* de mutantes derivados de 1021FDCSS. Se muestra el fenotipo simbiótico representativo mostrado por los mutantes en al menos dos experimentos independientes. En cada gráfica se compara el número medio de nódulos por planta formados por cada mutante con respecto al formado por la cepa parental 1021FDCSS. Las barras representan el error estándar con un intervalo de confianza del 95%.

En lo que al fenotipo de competitividad de los derivados de 1021FDCSS se refiere, obtuvimos que todos los mutantes compiten por la nodulación de manera similar a la parental salvo en el caso del transposante afectado en el gen *sodB*, que resultó ser un 50% menos competitivo por la nodulación de alfalfa que 1021FDCSS (figura 8).

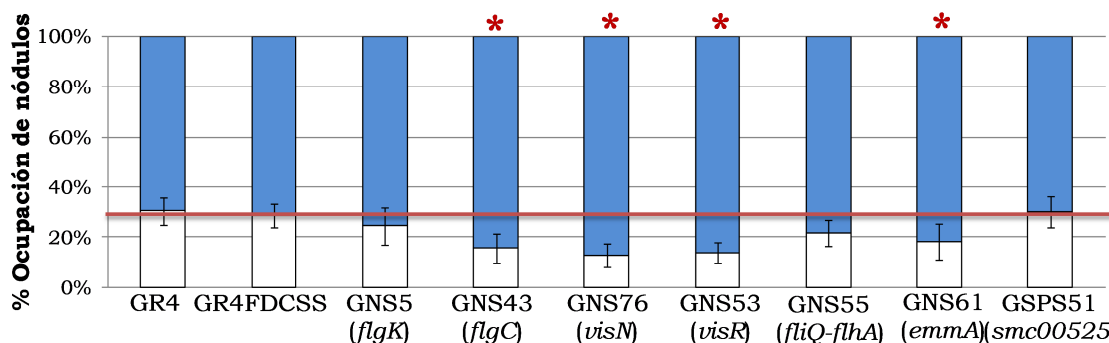


**Figura 8.** Porcentaje medio de ocupación de nódulos de los mutantes 1021FDCSS::Tn5 tras inocular con la cepa 1021(pGUS3) portadora del plásmido (pGUS3) en una proporción 1:1. Los nódulos ocupados por la cepa marcada con el gen reportero se tiñen de azul tras ser incubados con X-Gluc. Los datos muestran la media y el error estándar obtenidos de 24 plantas en dos experimentos independientes con un nivel de confianza del 95%. La línea roja indica el porcentaje de nódulos ocupados por la cepa de referencia, en este caso 1021FDCSS. (\*) Indica los mutantes cuya capacidad competitiva es significativamente distinta a la de referencia, según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

En cuanto al fenotipo simbiótico observado en los mutantes derivados de GR4FDCSS (figura 9), el mutante GNS61 afectado en *emma* (figura 9f) se mostró ligeramente más infectivo que la cepa parental. Por otro lado, GNS5 presentó cierto retraso en su cinética aunque acabó recuperándose, mientras que GSPS51 (fig. 9g) afectado en el gen *smc00525*, resultó ser claramente menos infectivo que la cepa de referencia. En los ensayos de competitividad (figura 10), los mutantes GNS43 (*flgC*), GNS76 (*visM*), GNS53 (*visR*) y GNS61 (*emma*) resultaron ser menos competitivos por la nodulación que GR4FDCSS.
















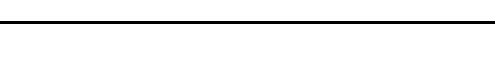
**Figura 9.** Eficiencia de nodulación en *M. sativa* de mutantes derivados de GR4FDCSS. Se muestra el fenotipo simbiótico representativo mostrado por los mutantes en al menos dos experimentos independientes. En cada gráfica se compara el número medio de nódulos por planta formados por cada mutante con respecto al formado por la cepa parental GR4FDCSS. Las barras representan el error estándar con un intervalo de confianza del 95%.



**Figura 10.** Porcentaje medio de ocupación de nódulos de los mutantes GR4FDCSS::Tn5 tras inocular con la cepa 1021(pGUS3) portadora del plásmido (pGUS3) en una proporción 1:1. Los nódulos ocupados por la cepa marcada con el gen reportero se tiñen de azul tras ser incubados con X-Gluc. Los datos muestran la media y el error estándar obtenidos de 24 plantas en dos experimentos independientes con un nivel del confianza del 95%. La línea roja indica el porcentaje de nódulos ocupados por la cepa de referencia, en este caso GR4FDCSS. (\*) Indica los mutantes cuya capacidad competitiva es significativamente distinta a la de referencia, según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).



Mutante	Gen afectado	Teórica función de la proteína	Localización de la inserción del Tn5	Movilidad en superficie	Swimming	Presencia de flagelos	Fenotipo simbiótico
<b>Transposantes derivados de 1021FDCSS::Tn5</b>							
<b>NS26</b>	<i>smc03030</i> ( <i>flgG</i> )	Proteína del eje del cuerpo basal flagelar		+	-	No	Nod <sup>+</sup> , Comp <sup>++</sup>
<b>NS2.9</b>	<i>smc03032</i> ( <i>flgI</i> )	Precursor de la proteína transmembrana del anillo P del flagelo		+	-	No	Nod <sup>++</sup> , Comp <sup>++</sup>
<b>NS302</b>	<i>smc03043</i> ( <i>motC</i> )	Precursor quimiotáctico transmembrana (proteína C de movilidad)		+	-	Sí	Nod <sup>++</sup> , Comp <sup>++</sup>
<b>NS320</b> NS30 NS321	<i>smc03034</i> ( <i>flgH</i> )	Proteína precursora del anillo L del flagelo		+	-	No	Nod <sup>++</sup> , Comp <sup>++</sup>
<b>NS33</b>	<i>smc00043</i> ( <i>sodB</i> )	Probable proteína superóxido dismutasa dependiente de hierro y manganeso		+++	+	Sí	Nod <sup>+</sup> , Comp <sup>++</sup>
<b>SPS324</b>	<i>smc03007</i> ( <i>cheA</i> )	Proteína implicada en quimiotaxis (histidín quinasa implicada en la transducción sensora)		+	+	Sí	Nod <sup>++</sup> , Comp <sup>+</sup>
<b>SPS1</b>	<i>smb20947</i> ( <i>exoX</i> )	Regulador post-transcripcional, proteína represora EPS I		++++	++	Sí	Nod <sup>++</sup> , Comp <sup>++</sup>
<b>Transposantes derivados de GR4FDCSS::Tn5</b>							
<b>GNS5</b>	<i>smc03048</i> ( <i>flgK</i> )	Putativa proteína asociada al gancho flagelar		-	-	No	Nod <sup>+</sup> , Comp <sup>++</sup>

<b>GNS43</b> GNS62	<i>smc03028</i> ( <i>flgC</i> )	Proteína del eje del cuerpo basal flagelar		-	-	No	Nod <sup>++</sup> , Comp <sup>+</sup>
<b>GNS76</b>	<i>smc03015</i> ( <i>visN</i> )	Regulador transcripcional tipo LuxR de genes implicados en movilidad		-	-	No	Nod <sup>++</sup> , Comp <sup>+</sup>
<b>GNS53</b> GNS52 GNS38	<i>smc03016</i> ( <i>visR</i> )	Regulador tipo LuxR de operones flagelares, que junto a VisN forma el activador transcripcional global heterodimérico		-	-	No	Nod <sup>++</sup> , Comp <sup>+</sup>
<b>GNS55</b>	<i>smc03054</i> ( <i>flhA</i> )	Probable proteína transmembrana implicada en biosíntesis flagelar		-	-	No	Nod <sup>++</sup> , Comp <sup>++</sup>
<b>GNS61</b>	<i>smb21521</i> ( <i>emmA</i> )	Proteína que forma parte de un sistema de tres componentes, implicado en la producción de exopolisacáridos, movilidad y respuesta de membrana a estrés		+	+	Sí	Nod <sup>++</sup> , Comp <sup>++</sup>
<b>GSPS51</b>	<i>smc00525</i>	Hipotética proteína transmembrana		+++	++	Sí	Nod <sup>+</sup> , Comp <sup>++</sup>

**Tabla 1.** Resumen de los fenotipos y representación esquemática de los sitios de inserción del Tn5 de los transposantes derivados de 1021FDCSS y GR4FDCSS. En la primera columna se indican todos los transposantes aislados en este estudio afectados en el mismo gen, en negrita se resalta el mutante seleccionado para la caracterización posterior. La cuantificación de los diferentes fenotipos se representa mediante (+), tomándose como referencia la cepa parental (++) que representa el fenotipo presentado por el correspondiente mutante en el gen *fadD*, (+++/++++) fenotipo incrementado, (+) fenotipo reducido, (-) ausencia de movilidad en superficie/*swimming*. (Nod) Eficiencia de nodulación. (Comp) Capacidad competitiva comparada con la cepa parental.

# **CAPÍTULO I. DISCUSIÓN**



En estudios anteriores a este trabajo se había probado que *S. meliloti* es capaz de desplazarse sobre la superficie de medios semisólidos. Esta capacidad sin embargo, varía entre distintas cepas. Así, mientras las cepas Rm1021/Rm2011 mostraban translocación en MM semisólido con cierta frecuencia, GR4 nunca exhibió desplazamiento en superficie (Nogales *et al.*, 2012). De los pocos estudios realizados, existían datos que sugerían que independientemente del fondo genético, el gen *fadD* que codifica una proteína implicada en metabolismo lipídico, desempeña un papel clave en el control de la movilidad en superficie en *S. meliloti* ya que mutaciones por pérdida de función en este gen promueven dicha translocación (Nogales *et al.*, 2010; Soto *et al.*, 2002). Es necesario aclarar aquí que el movimiento en superficie presentado por los mutantes *fadD* de *S. meliloti* así como el mostrado por las cepas silvestres Rm1021/Rm2011 fue descrito inicialmente como *swarming*, un tipo de translocación cuya característica esencial es la de ser un movimiento absolutamente dependiente de flagelos (Kearns, 2010). No obstante, un estudio posterior puso de manifiesto la complejidad del movimiento manifestado por Rm1021 que es capaz de mostrar desplazamiento en superficie utilizando mecanismos dependientes e independientes de acción flagelar (Nogales *et al.*, 2012). Por ello, y para evitar confusiones, hablaremos de movilidad en superficie en todos aquellos casos en los que no se haya demostrado experimentalmente la esencialidad de los flagelos.

Para comprender el mecanismo por el cual la pérdida de función de *fadD* en *S. meliloti* promueve translocación en superficie en dos cepas en las que este tipo de movimiento parece estar regulado de modo distinto, se han aislado y caracterizado transposantes derivados de las cepas GR4FDCSS y 1021FDCSS.

Se han identificado un total de 14 mutantes que mostraron una capacidad de translocar en superficie distinta a la de la cepa parental: 7 derivados del mutante *fadD* de Rm1021, y 7 derivados del mutante *fadD* de GR4 (Tabla 1). Estos mutantes se han aislado tras el escrutinio de 5820 y 4000 transposantes de cada mutateca, por lo que es muy probable que no hayamos identificado todos los genes que pueden estar implicados en desplazamiento en superficie asociado a una mutación *fadD* en *S. meliloti*. La mayoría de los mutantes seleccionados (11) presentaron una reducción o pérdida total de movimiento en superficie, mientras que 3 de ellos mostraron mayor eficiencia de translocación que la correspondiente cepa parental. Esto sugiere que en

este tipo de movilidad participan determinantes genéticos que ejercen un papel positivo sobre el movimiento en superficie y otros que de alguna manera lo reprimen. El fenotipo mostrado por cada mutante puede ser el resultado de la inactivación del gen cuya secuencia ha sido interrumpida por la inserción del transposón (Tabla 1) y/o un posible efecto polar sobre genes localizados aguas abajo. A falta de reconstruir las mutaciones mediante delección en fase o bien de experimentos de complementación, tampoco podemos descartar que algunos de los efectos observados sean consecuencia de mutaciones secundarias no directamente relacionadas con el evento de transposición.

Uno de los hechos que primero llamó la atención de los resultados obtenidos en este estudio fue que el análisis de la mutateca GR4FDCSS::Tn5 permitiera identificar hasta 5 transposantes de los 4000 analizados que se comportaron como no móviles en superficie, y que por el contrario, ninguno de los 5820 transposantes analizados de la mutateca 1021FDCSS::Tn5 fue completamente defectivo en este tipo de translocación. Este resultado corrobora la existencia de distintos mecanismos responsables del movimiento en superficie en los dos fondos genéticos analizados. Hoy sabemos que a diferencia de GR4 y su mutante *fadD*, Rm1021 y 1021FDCSS producen el sideróforo Rhb1021 que gracias a su actividad surfactante facilita el desplazamiento en superficie de estas cepas participando tanto en mecanismos dependientes como independientes de flagelos (Nogales *et al.*, 2010, 2012). Que no se hayan identificado transposantes derivados de 1021FDCSS afectados en genes esenciales en la producción del sideróforo (*rhb* o *rhrA*) tiene su explicación en el hecho demostrado de que una mutación *fadD* anula el defecto en translocación característico de mutantes defectivos en la síntesis de Rhb1021 (Nogales *et al.*, 2010).

La mayoría de los mutantes identificados (12 de 14) son mutantes afectados en movilidad en general ya que además de mostrar alteraciones (principalmente reducción o pérdida total) en translocación en superficie, se encuentran afectados en movilidad *swimming*. No obstante, se ha logrado identificar 2 mutantes (SPS1 y GSPS51, afectados en los genes *exoX* y *smc00525*, respectivamente) que presentando idéntica movilidad *swimming* a la de la correspondiente cepa parental, exhiben mayor translocación en superficie, lo que refuerza la hipótesis de la existencia de determinantes genéticos exclusivos implicados en migración en superficie. El hecho de que no

se hayan identificado mutantes que no estando afectados en movilidad *swimming* presenten menor movilidad en superficie, podría ser consecuencia de estar trabajando con fondos *fadD*. Nuestra hipótesis es que en ausencia de un gen *fadD* funcional, la bacteria produce un compuesto que no está presente (o es inactivo) en la cepa silvestre, que facilita la migración en superficie incluso en mutantes defectivos en sideróforo Rhb1021. Dicho compuesto podría ser al menos la metilcetona 2-tridecanona (2-TDC), compuesto acumulado diferencialmente en mutantes *fadD* de *S. meliloti* que promueve migración en superficie en distintas bacterias (capítulo 3). Por tanto, la identificación de componentes que tengan una función positiva y específica en la translocación en superficie de *S. meliloti* quizás requeriría de un escrutinio adicional de mutantes obtenidos en fondos *fadD*<sup>-</sup>. La reciente identificación de nuevas condiciones experimentales (utilización de agar noble; ver capítulo 3) que permiten poner de manifiesto más fácilmente y de manera más reproducible el comportamiento móvil de las cepas silvestres GR4 y Rm1021, sin duda facilitará esta tarea.

La caracterización genética de los distintos transposantes obtenidos en este estudio ha permitido comprobar que hasta un total de 10 mutantes se encontraban afectados en genes del regulón flagelar, poniendo así de manifiesto la importancia de la acción de los flagelos en el desplazamiento en superficie de *S. meliloti*, o lo que es lo mismo, evidenciando la existencia de *swarming*. Así, entre los genes afectados por la inserción del Tn5 se han identificado 2 genes que codifican el regulador maestro del regulón flagelar en *S. meliloti* (*visN* y *visR*), 5 genes estructurales del flagelo (*flgC*, *flgG*, *flgH*, *flgI*, *flgK*), 1 gen del motor flagelar (*motC*), 1 gen que codifica uno de los elementos que conforman el sistema de secreción flagelar (*flhA*), y el gen de quimiotaxis *cheA*. A excepción de los mutantes en los que el Tn5 afectó los genes *motC* y *cheA* (mutantes NS302 y SPS324, respectivamente), el resto de transposantes afectados en genes del regulón flagelar carecían de flagelos lo que explica su imposibilidad de mostrar movilidad *swimming* y su clara reducción o bloqueo total de la movilidad en superficie. El transposante afectado en *motC* es flagelado. En *S. meliloti*, MotC es una proteína que interacciona con el dominio periplásmico de MotB facilitando el flujo de protones a través del canal MotA-MotB, flujo que proporciona la energía necesaria para la rotación flagelar. La ausencia de MotC provoca que los flagelos se paralicen (Eggenhofer *et al.*,

2004; Eggenhofer *et al.*, 2006; Platzer *et al.*, 1997). El fenotipo flagelado mostrado por NS302 (*motC*) implica, por un lado, que la inserción del transposón no bloquea la expresión del gen *fliK* que codifica el regulador de la longitud del gancho flagelar y cuya ausencia en *S. meliloti* da lugar a la formación de ganchos flagelares muy alargados (“polyhooks”) sin filamento (Eggenhofer *et al.*, 2006). Por otro, que el defecto en movilidad mostrado por el mutante afectado en *motC* es consecuencia de la parálisis flagelar.

En el mutante SPS324, el transposón se encuentra interrumpiendo el gen que codifica la autoquinasa de quimiotaxis CheA, aunque probablemente la inserción afecta a la expresión del resto de genes *che* que forman parte del mismo operón. CheA es responsable de fosforilar el regulador de respuesta CheY2 que en su forma activa interacciona con el motor flagelar reduciendo la velocidad de rotación de los flagelos, por lo que mutantes *cheA* de *S. meliloti* muestran siempre máxima velocidad de rotación, *free-swimming* y reducción en el tamaño del halo obtenido en ensayos de movilidad *swimming* (Sourjik (Schmitt, 2002; Sourjik and Schmitt, 1996). En concordancia con esto, el mutante SPS324 muestra menor movilidad *swimming* que la cepa parental. Sin embargo, la mayor translocación mostrada en superficie por este mutante resultó llamativa teniendo en cuenta que en bacterias como *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *E. coli* y *Salmonella*, el sistema de quimiotaxis, pero no la quimiotaxis, es importante para la movilidad tipo *swarming* (Burkart *et al.*, 1998). La observación de que mutantes *che* de *E. coli* y *Salmonella* tenían menos flagelos y más cortos y que las colonias aparecían menos hidratadas durante el desplazamiento en superficie, llevó al descubrimiento de que en estas bacterias el flagelo actúa como sensor de las condiciones de humedad del medio: condiciones externas de hidratación subóptimas podrían provocar que el flagelo quedara atrapado en la superficie del agar, lo que interfiere con la secreción de subunidades de flagelina y del factor anti-sigma FlgM, afectando el crecimiento normal del filamento. La hidratación de la superficie (directamente o mediante adición de osmolitos) soluciona el defecto en movilidad *swarming* de mutantes *che*. La capacidad de cambiar el sentido de rotación de los flagelos contribuye a la hidratación de la colonia (se piensa que controlando la producción de un osmolito), permitiendo la secreción y expresión adecuada de genes flagelares tardíos, se contribuye así a la movilidad *swarming* (revisado en Partridge and Harshey 2013a; Partridge and



Harshey 2013b). El hecho de que un mutante *cheA* de *S. meliloti* no sólo no esté impedido en el desplazamiento en superficie, sino incluso favorecido, quizás tenga su explicación en el distinto mecanismo que gobierna la quimiotaxis en esta bacteria donde el cambio en dirección del movimiento no se consigue con cambios en el sentido de rotación del flagelo, sino con cambios en la velocidad de rotación. La máxima rotación flagelar mostrada por mutantes *cheA* de *S. meliloti* quizás podría contribuir más eficientemente a la hidratación de la colonia en desplazamiento. Con objeto de corroborar la necesidad o no de genes de quimiotaxis en el movimiento en superficie de *S. meliloti*, en el siguiente capítulo se analiza el comportamiento móvil de mutantes *cheA* obtenidos por delección en fase.

Además de genes directamente relacionados con movilidad, nuestro estudio ha puesto de manifiesto la participación en la translocación en superficie de mutantes *fadD* de *S. meliloti* de otros genes con diversas funciones como *sodB*, *exoX*, *emma* o *smc00525*. La implicación en la movilidad *swarming* de genes que participan en funciones celulares adicionales a las de movilidad es un hecho que ha sido constatado en otras bacterias como *S. enterica*, *E. coli* y *P. aeruginosa* donde, entre otros, se han identificado genes implicados en metabolismo, secreción, adquisición de hierro, síntesis de componentes de la superficie celular, reguladores etc, (Inoue *et al.*, 2007; Kim and Surette, 2004; Overhage *et al.*, 2007).

Especialmente curiosa fue la caracterización del mutante NS33 como un transposante afectado en el gen *sodB* (también denominado *sodA*) que codifica la única superóxido dismutasa (SOD) citoplasmática de *S. meliloti* y que es atípica por ser capaz de actuar tanto con Fe como con Mn como cofactores (Santos *et al.*, 1999). Mutantes defectivos en este gen crecen normalmente y son sólo parcialmente sensibles a estrés oxidativo en vida libre. Sin embargo, están severamente afectados en todas las etapas de la simbiosis con plantas de alfalfa: infección, nodulación, diferenciación a bacteroides y fijación de N (Santos *et al.*, 2000). El mutante NS33 es defectivo en movilidad en general al mismo tiempo que no muestra deficiencias en crecimiento. Es difícil explicar el efecto en movilidad causado por una mutación que teóricamente conlleva la producción de una SOD a la que le faltarían sólo los 6-7 aminoácidos del C-terminal. El fenotipo móvil de NS33 unido a un fenotipo simbiótico que claramente difiere de lo descrito para un mutante *sodA/B* de *S. meliloti* (NS33

sólo presenta un defecto en competitividad por la nodulación), obliga a una investigación más exhaustiva de la posible implicación de este gen o regiones de ADN adyacentes en el control de la movilidad en superficie de *S. meliloti*, estudio que no ha sido abordado en este trabajo de Tesis doctoral.

La identificación de dos genes implicados en regulación de exopolisacáridos (EPS) (*exoX* y *emma*) apuntaba a un posible papel de estas macromoléculas en la movilidad en superficie de *S. meliloti*, hipótesis que fue posteriormente corroborada llevando a cabo un estudio más detallado del gen *exoX* (capítulo 2; Nogales *et al.*, 2012). El transposante SPS1 está alterado específicamente en movilidad en superficie mostrando mayor capacidad de translocación que la cepa parental. Este mutante se encuentra afectado en el gen *exoX* que codifica un regulador post-transcripcional de la síntesis de EPS I o succinoglucano (Reed *et al.*, 1991). Mutantes delecionados en este gen producen mayores niveles de EPS I. La implicación de polisacáridos extracelulares en el desplazamiento en superficie ha sido descrita en distintas bacterias. Así, en *Myxococcus xanthus*, además de pili tipo IV y lipopolisacáridos, la síntesis de EPS juega un papel crucial en el desarrollo de esta movilidad (Lu *et al.*, 2005). De forma similar, el polisacárido ácido de *P. mirabilis* (denominado Cmf por Colony Migration Factor) facilita el *swarming* (Gygi *et al.*, 1995a). En *S. meliloti*, la gran producción de EPS II o galactoglucano asociada a cepas *expR<sup>t</sup>*, facilita la translocación en superficie por un mecanismo independiente de acción flagelar (Nogales *et al.*, 2012). Se piensa que la producción de estos EPS contribuye a la extracción de agua del medio y consiguiente hidratación de la colonia, requisito fundamental en el desplazamiento en superficie (Partridge and Harshey, 2013). Como ya se ha mencionado, la demostración de la participación de *exoX* y EPS I en la movilidad en superficie de *S. meliloti* se detallará en el capítulo 2.

El segundo gen implicado en regulación de la síntesis de EPS e identificado en este estudio es *emma*, gen afectado en el transposante GNS61. EmmA es una proteína pequeña, de probable localización periplásmica, que junto con el sistema regulador de dos componentes EmmBC contribuye a proteger a las células de posibles estreses medioambientales, controlando la producción de EPS y su movilidad (Morris and González, 2009). Mutaciones en cualquiera de los genes *emm* conlleva a un incremento en producción de EPS I, defectos en movilidad, mayor sensibilidad a estreses que afectan la membrana, y ciertos

defectos simbióticos en ausencia del gen *exoY*. En el trabajo desarrollado por Morris y González (2009) un mutante *emmA* derivado de la cepa Rm1021 se ha descrito como no móvil y, aunque no observan por TEM la presencia o no de flagelos, experimentos de Western revelan niveles de flagelina en el mutante *emmA* similares a los de un mutante aflagelado *flaAflaB*. A diferencia del mutante descrito por Morris y González (2009), GNS61 sí muestra cierta movilidad *swimming*, aunque reducida y con un halo de expansión menos intenso que el de la cepa silvestre, sólo apreciable tras 48 horas de incubación. Su observación al microscopio electrónico muestra la ausencia de flagelos de forma generalizada, aunque algunas células sí los poseen. En cualquier caso, nuestros datos parecen indicar que *emmA* participa en control de movilidad general, probablemente regulando la expresión de genes flagelares.

El aislamiento y caracterización del mutante GSPS51 nos ha permitido asignar una función al gen *smc00525*. Una mutación en dicho gen no afecta movilidad tipo *swimming*, pero sí produce mayor translocación en superficie, sugiriendo que es un determinante genético exclusivo que controla de forma negativa la migración en superficie, al menos en un fondo *fadD* de GR4. Aunque el producto de este gen, una proteína transmembrana de gran tamaño, no tiene una función asignada, sí tiene características compartidas por proteín-quinazas, por lo que se puede especular con que quizás se trate de una proteína reguladora. En el siguiente capítulo de este trabajo se describe una investigación más detallada sobre el papel que desempeña este gen en la movilidad de distintas cepas de *S. meliloti*.

Todos los mutantes afectados en movilidad en superficie obtenidos en nuestro estudio fueron capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de alfalfa, aunque 9 de ellos (64%) mostraron algún defecto en infectividad o competitividad por la nodulación. El hecho de que hasta 5 transposantes totalmente defectivos en movilidad (GNS5, GNS43, GNS53, GNS55 y GNS76) sigan siendo capaces de establecer simbiosis fijadora de N, refuerza la noción asumida de que la movilidad de los rizobios no es esencial para la nodulación ni la fijación de nitrógeno. En un estudio previo llevado a cabo en el grupo de la Dra. Hirsch (Fujishige *et al.*, 2006c), se observó que mutantes *fliP* y *flgH* derivados de Rm1021, aflagelados e incapaces de mostrar movilidad *swimming*, mostraban un retraso en nodulación. De los resultados obtenidos

en este estudio, sin embargo, no podemos establecer una correlación obvia entre ausencia de flagelos y el consiguiente bloqueo o reducción en movilidad, y la existencia de defectos en el proceso de nodulación. Así, de los 8 mutantes aflagelados identificados, 5 presentaron algún defecto en infectividad o competitividad. No obstante, es importante recordar que los mutantes aquí caracterizados se han obtenido sobre fondos *fadD*, están afectados en genes que pertenecen a distintas clases del regulón flagelar, y que los experimentos se han realizado en condiciones óptimas (alta cantidad de inóculo y ausencia de condiciones ambientales adversas y de otros microorganismos competidores). Conociendo que en diversas bacterias se ha demostrado la regulación coordinada de genes del regulón flagelar con genes no flagelares (Anderson *et al.*, 2010; Burch *et al.*, 2012), o la secreción a través del T3SS del flagelo de factores con papel importante en la interacción con un hospedador eucariota, (revisado en Duan *et al.*, 2013), nos obliga a ser cautelosos a la hora de sacar conclusiones sobre el papel de los flagelos o de la movilidad en *S. meliloti* a partir de resultados obtenidos con mutantes aflagelados que no han sido sometidos a una caracterización más profunda.

Tampoco nos es posible establecer una correlación entre mayor desplazamiento en superficie y algún efecto en el establecimiento de simbiosis. De tres transposantes hipermóviles (afectados en *cheA*, *exoX* y *smc00525*), dos de ellos presentaron menor grado de infectividad, mientras el transposante afectado en *exoX* tuvo el mismo comportamiento que la cepa parental. Si a todo esto le unimos el descubrimiento de que *S. meliloti* es capaz de desplazarse en superficie utilizando mecanismos dependientes de flagelos (*swarming*) como independientes de flagelos, el resultado es un alto nivel de complejidad en un fenotipo, la movilidad, que ha sido escasamente investigado en esta bacteria.

Hasta la fecha se ha demostrado que una gran variedad de bacterias tienen la habilidad de moverse sobre superficies semisólidas, y que en este comportamiento hay implicados una gran cantidad de genes estrictamente regulados. En este capítulo, mediante una aproximación genética, hemos iniciado la identificación de los determinantes genéticos que gobiernan el desplazamiento en superficie de mutantes *fadD* de *S. meliloti*, habiéndose identificado distintas funciones que ejercen o bien un control positivo o negativo sobre este tipo de movilidad. La participación de algunos de los genes

más interesantes identificados en este estudio, tanto en la movilidad en superficie de esta bacteria, como en formación de biopelícula y fenotipo simbiótico ha sido investigada en profundidad en el siguiente capítulo.



# **CAPÍTULO I. ANEXOS**



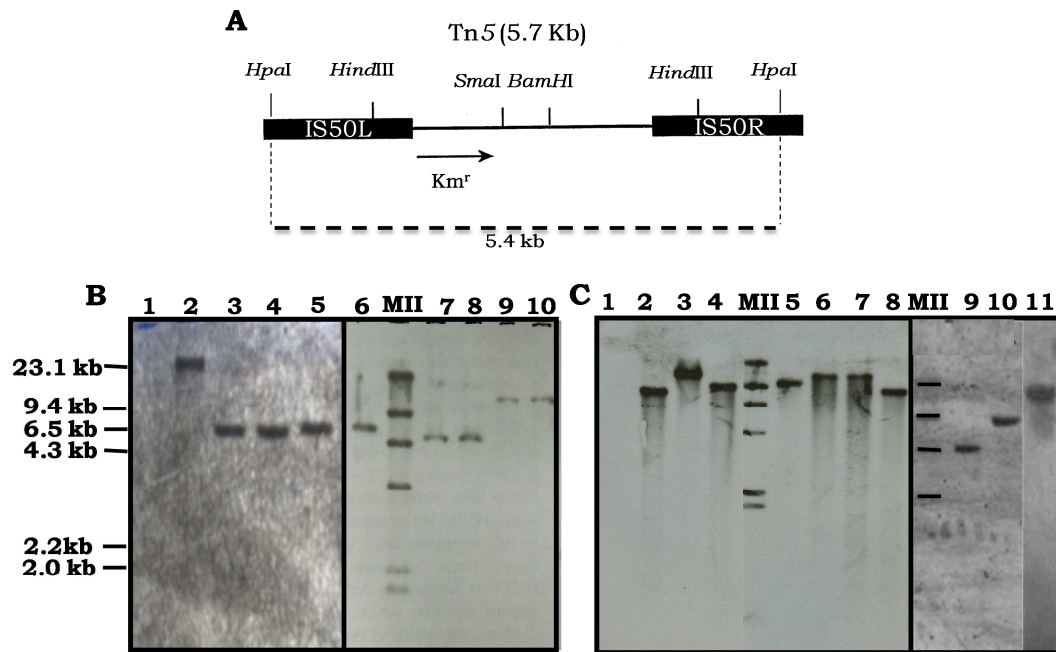


**Anexo 1. Caracterización genética de los mutantes alterados en movilidad en superficie.**

Para conocer el número de inserciones del Tn5 presentes en los transposantes seleccionados, se llevaron a cabo hibridaciones del ADN genómico de cada mutante digerido con *EcoRI* o *BamHI* con una sonda correspondiente a un fragmento del transposón, concretamente el fragmento *HpaI* de 5.4 Kb del vector pSUP2021. En la figura A1.1 se muestran los resultados obtenidos de las hibridaciones y en la tabla A1.1 se recopilan los tamaños de las bandas *EcoRI* y *BamHI* de cada mutante

La digestión del ADN genómico con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* permitió no sólo determinar el número de inserciones del Tn5 presentes en cada mutante, sino también elegir la mejor estrategia de clonaje para la posterior identificación del gen afectado por la inserción del transposón. Para esto último, se procedió a clonar en el plásmido pUC18 o pBSKS(+) bien el fragmento de ADN genómico *EcoRI* que contenía el Tn5 completo, o bien el fragmento *BamHI* conteniendo el brazo del transposón que alberga el gen de resistencia a la kanamicina (figura A1.1 A).

Una vez obtenidos los plásmidos recombinantes, se procedió a secuenciar el ADN genómico adyacente al Tn5 usando, o bien cebadores derivados de la secuencia del vector para el caso de los clones *EcoRI*, o bien un oligo correspondiente a la secuencia de inserción (IS) del transposón, para los casos en los que el ADN genómico se clonó como fragmento *BamHI*. Esta estrategia tuvo éxito en todos los casos excepto para el mutante NS320 donde no fue posible obtener clones kanamicina resistentes. En este caso, y en el del transposante NS2.9, la identificación del ADN genómico adyacente al transposón se consiguió secuenciando con el oligo IS50(2) un producto de PCR obtenido mediante la metodología de PCR arbitraria descrita en Materiales y métodos.



**Figura A1.1.** (A) representación esquemática del Tn5. La línea discontinua representa el fragmento *Hpa*I que se usó como sonda en las hibridaciones de ADN genómico de los transposantes. Comprobación del número de inserciones Tn5 presentes en los mutantes seleccionados de la mutateca 1021FDCSS::Tn5 (B) y GR4FDCSS::Tn5 (C), respectivamente, mediante hibridación del ADN genómico digerido con *Eco*RI usando como sonda el fragmento *Hpa*I del transposón. Carriles: (B) 1.1021FDCSS (cepa parental, ausencia del Tn5) 2.NS302, 3.NS320 4.NS321, 5.SPS324, 6.NS2.9, 7.NS26, 8.NS30 9.NS33 10.SPSI. (C) 1.GR4FDCSS (cepa parental, ausencia del Tn5), 2.GNS5, 3.GNS38, 4.GNS43, 5.GSPS51, 6.GNS52, 7.GNS53, 8.GNS55, 9.GNS61, 10.GNS62, 11.GNS76. MII, Marcador de peso molecular (ADN de fago  $\lambda$  digerido con *Hind*III) marcado con digoxigenina.

**Tabla A1.1** Tamaño aproximado de los fragmentos resultantes de digestiones *EcoRI* y *BamHI* del ADN genómico de los transposantes 1021FDCSS::Tn5 y GR4FDCSS::Tn5, que hibridaron con una sonda correspondiente a Tn5. Se incluyen los clones derivados del mismo transposante de cada una de las mutatecas.

<b>Mutateca</b>	<b>Transposante</b>	<b>Tamaño banda digestión <i>EcoRI</i></b>	<b>Tamaño banda digestión <i>BamHI</i></b>
<b>1021FDCSS</b>	<b>NS26</b>	6.9 kb	4.3 kb y 3.3 kb
	<b>NS30</b>	7 kb	13 kb y 6.3 kb
	<b>NS33</b>	15 kb	7 kb y 5 kb
	<b>NS302</b>	>23 kb	3.8 kb y 3.3 kb
	<b>NS320</b>	7 kb	13 kb y 6.3 kb
	<b>NS321</b>	7 kb	13 kb y 6.3 kb
	<b>NS324</b>	8 kb	9 kb y 6 kb
	<b>SPS1</b>	15 kb	10 kb y 8.5 kb
	<b>NS 2.9</b>	7.8 kb	No ha sido digerido
<b>GR4FDCSS</b>	<b>GNS5</b>	8.5 kb	No ha sido digerido
	<b>GNS38</b>	16 kb	No ha sido digerido
	<b>GNS43</b>	10 kb	4 kb y 3.3 kb
	<b>GSPS51</b>	11 kb	9 kb y 3.3 kb
	<b>GNS52</b>	16 kb	6.8 kb y 4 kb
	<b>GNS53</b>	16 kb	6.8 kb y 4 kb
	<b>GNS55</b>	9 kb	3.8 kb y 3.3 kb
	<b>GNS61</b>	6.6 kb	No ha sido digerido
	<b>GNS62</b>	10 kb	No ha sido digerido
	<b>GNS76</b>	15-20 kb	6.5 kb y 4 kb



## **CAPÍTULO II**



## **2. Caracterización funcional de *cheA*, *exoX* y *smc00525* en distintos fondos genéticos de *S. meliloti*: Participación en movilidad en superficie, formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis con alfalfa.**

El aislamiento y caracterización genética de transposantes derivados de mutantes *fadD* de *S. meliloti* alterados en translocación en superficie nos permitió poner de manifiesto que este tipo de movilidad requiere la participación de diversos genes, entre ellos genes flagelares, quimiotaxis, genes de respuesta a estreses ambientales, reguladores de la producción de exopolisacárido, así como genes de función aún desconocida (Capítulo 1). Como ya se ha mencionado, en este estadio de caracterización no es posible descartar que algunos de los fenotipos observados fuesen consecuencia de efectos polares o mutaciones secundarias no relacionadas con el evento de transposición. De los 14 transposantes seleccionados, doce resultaron estar afectados en genes que participan en movilidad general, ya que los mutantes además de presentar alteraciones en la translocación en superficie, mostraron reducciones notables en movilidad *swimming* en comparación con sus correspondientes cepas parentales. Con la salvedad del gen *cheA*, estos genes no se han caracterizado con mayor profundidad en este trabajo.

Con el objetivo de obtener mayor conocimiento sobre componentes requeridos específicamente en la movilidad en superficie de *S. meliloti*, nuestra atención se centró en dos transposantes que mostrando igual movilidad *swimming* que su correspondiente cepa parental, sin embargo eran hipermóviles en superficie: el mutante SPS1 derivado de 1021FDCSS afectado en el gen *exoX* que codifica un regulador post-traducciona l de la síntesis de EPS I (Reed et al. 1991), y el mutante GSPS51 derivado de GR4FDCSS afectado en el gen *smc00525* que potencialmente codifica una proteína transmembrana de gran tamaño (1138 aas) de función desconocida. En el segundo caso, además, el transposante mostró la característica interesante de ser menos infectivo en plantas de alfalfa que la cepa parental. Por otro lado, el fenotipo particular mostrado por el mutante SPS324 (*cheA*:Tn5) en translocación en superficie, contrario a lo descrito para mutantes *cheA* de bacterias como *E. coli*, *Salmonella* o *Serratia* (revisado en Partridge and Harshey 2013a), unido a su defecto en infectividad, también nos llevó a investigar la posible función de la

autoquinasa de quimiotaxis CheA en el control de la movilidad en superficie de *S. meliloti*.

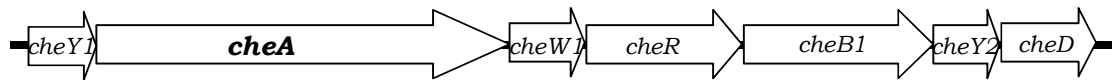
**2.1 Obtención de mutantes por delección en los genes *cheA*, *exoX* y *smc00525*, identificados previamente por su posible implicación en movilidad en superficie de *Sinorhizobium meliloti*, en las cepas GR4 y Rm1021 así como en sus correspondientes derivados *fadD*.**

Como primer paso en la caracterización, se decidió corroborar que los fenotipos presentados por los transposantes eran consecuencia de la inactivación del gen interrumpido por el Tn5. Para ello, se abordó la construcción de nuevos mutantes en los genes *cheA*, *exoX* y *smc00525* sustituyendo el alelo silvestre por una versión delecionada y sin marcador, en el fondo genético en el que fue identificada la inserción del Tn5 (1021FDCSS para el caso de los genes *cheA* y *exoX*; GR4FDCSS para el caso de *smc00525*). Además, como conocemos que el control del *swarming* es distinto dependiendo de la cepa de *S. meliloti* de la que se trate (GR4 o Rm1021)(Nogales *et al.*, 2010), y de la presencia o no de un gen *fadD* funcional, para comprobar la función de los 3 genes seleccionados tanto en movilidad como en simbiosis, se decidió ampliar el objetivo y llevar a cabo la mutagénesis en 4 fondos genéticos distintos: GR4, GR4FDCSS (GR4*fadD*), Rm1021 y 1021FDCSS (1021*fadD*). La estrategia utilizada para la obtención de los distintos mutantes se detalla en el apartado 2.1 de Anexos.

**2.1.1 Caracterización fenotípica de mutantes de *S. meliloti* delecionados en el gen *cheA* (*smc03007*).**

Como se ha comentado anteriormente, el transposante SPS324 afectado en el gen *cheA*, aunque se encontraba seriamente afectado en movilidad *swimming*, mostró mayor translocación en superficie en placas de MM semisólido que la cepa 1021*fadD* de la que deriva. El hecho de que dicha movilidad no se viera afectada negativamente, como se ha descrito que ocurre en mutantes *cheA* de otras bacterias, unido al hecho posible de que el fenotipo mostrado por nuestro transposante (hipermovilidad en superficie y menor capacidad infectiva) fuese resultado de un efecto polar de la inserción del transposón sobre el resto de genes *che* situados aguas abajo en el mismo operón (figura 1), motivó realizar una caracterización más detallada del posible papel de este gen en control de la movilidad en superficie de *S. meliloti*.



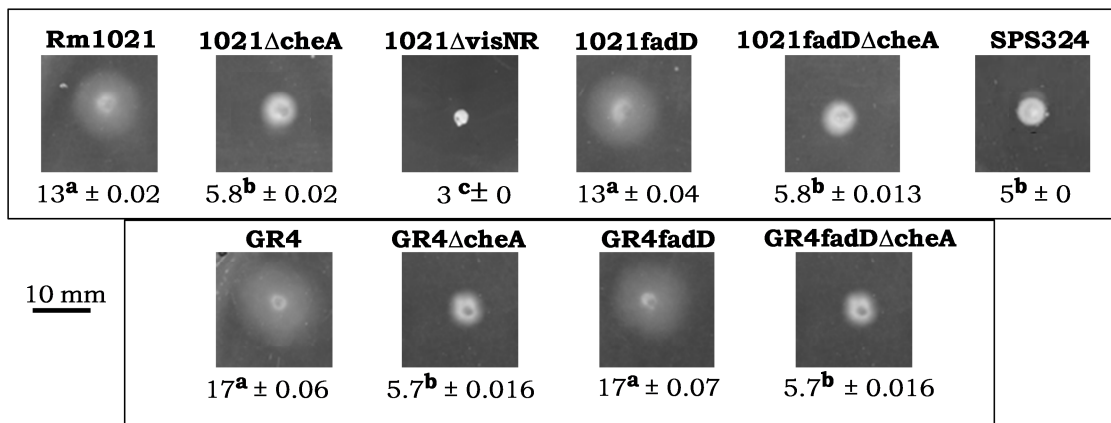


**Figura 1.** Contexto genómico de *cheA* (*smc03007*) en *S. meliloti* Rm1021. *CheY1* codifica una proteína reguladora de quimiotaxis, *cheW1* una proteína de quimiotaxis, *cheR* metiltransferasa, *cheB1* una metilesterasa, *cheY2* el regulador de respuesta y *cheD* otra probable proteína quimiotáctica.

El producto de 758 aminoácidos codificado por el gen *cheA* es la autoquinasa/fosfotransferasa del sistema de quimiotaxis de *S. meliloti*. CheA es responsable de controlar la velocidad de rotación del motor flagelar mediante fosforilación del regulador de respuesta CheY2. Al disminuir la concentración de una sustancia quimioatrayente, se produce la activación de la quinasa CheA que se autofosforila y posteriormente transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta CheY2 que en su forma activada reduce la velocidad de rotación del motor flagelar (Schmitt, 2002). Un mutante de *S. meliloti* delecionado en el gen *cheA* presenta máxima velocidad de rotación del motor flagelar, máxima velocidad de natación y *smooth swimming* (movimientos natatorios en línea recta sin *tumbles*) con o sin estimulación táctica (Sourjik and Schmitt 1996). El diámetro de movilidad *swimming* mostrado por este mutante es significativamente inferior al mostrado por la cepa silvestre (Sourjik and Schmitt 1996).

#### 2.1.1.1 Movilidad

Una vez construidos los cuatro mutantes delecionados en *cheA* (ver apartado 2.1.1 de los anexos), éstos se sometieron a ensayos de movilidad en superficie así como de movilidad *swimming*. Todos los mutantes delecionados en el gen *cheA* mostraron una clara reducción en el diámetro del anillo de movilidad *swimming* en comparación con sus correspondientes cepas parentales (fig. 2), mostrando un comportamiento idéntico al transposante SPS324 (1021FDCSS*cheA*::Tn5), y similar al previamente descrito para un mutante delecionado en *cheA* de la cepa RU11 de *S. meliloti* (Sourjik and Schmitt 1996).



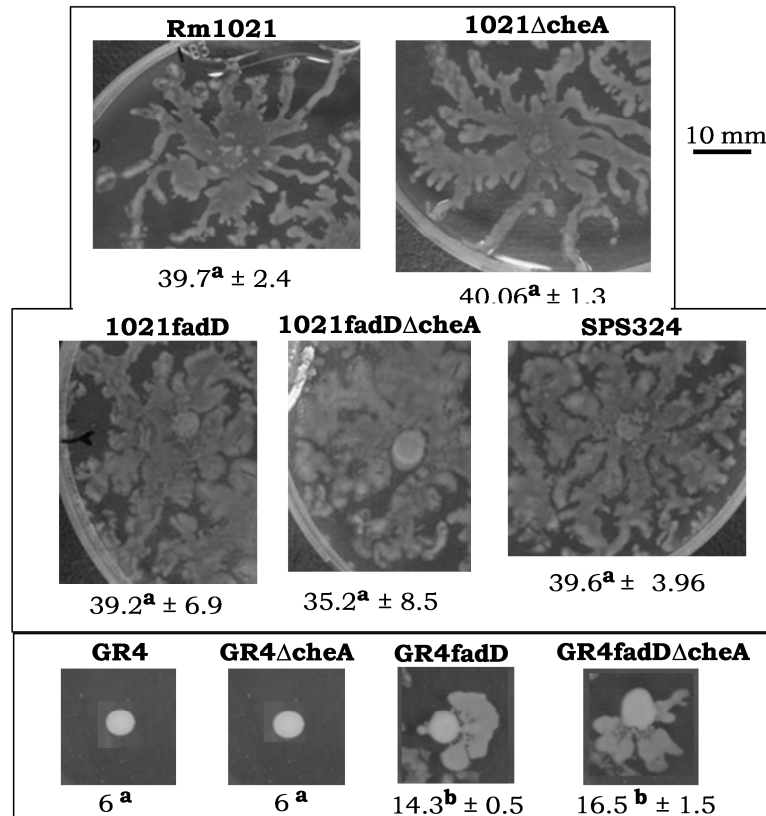
**Figura 2.** Fotos representativas de movilidad *swimming* tras 48 h de incubación de cepas de *S. meliloti* delecionadas en el gen *cheA*, sus correspondientes cepas parentales, y el transposante SPS324 (1021FDCSS*cheA*::Tn5). Además, se muestra el comportamiento no móvil de un mutante aflagelado (*visNR*). Bajo cada imagen se indica el halo medio de expansión y el error típico medido en milímetros de tres experimentos independientes con un mínimo de dos réplicas técnicas. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

Al realizar los ensayos de movilidad en superficie, llamó la atención que a pesar de que el transposante SPS324 había sido aislado por su comportamiento hipermóvil, en los nuevos ensayos realizados, tanto SPS324 como la cepa delecionada 1021fadDΔ*cheA* tuvieron un comportamiento similar al de la cepa parental 1021fadD (fig. 3). No sabemos a qué puede ser debido este distinto comportamiento. Es de destacar, no obstante, el hecho de que las cepas Rm1021 y 1021fadD presentaran en estos nuevos ensayos mayor capacidad de translocación que en los realizados durante la selección de los transposantes (medias de expansión de unos 40 mm frente a los 21 mm de ensayos previos, ver fig. 3 de capítulo I). La posibilidad de que la hipermovilidad asociada a una mutación *cheA* sólo se ponga de manifiesto en condiciones más restrictivas para la translocación en superficie no ha sido analizada.

Por otro lado, se ha podido comprobar que la deleción del gen *cheA* no induce la aparición de movilidad en superficie en la cepa GR4, una cepa que hasta el momento no ha mostrado este tipo de movilidad en nuestras condiciones experimentales. Además, la pérdida del gen *cheA* tampoco parece alterar la translocación en superficie mostrada por las cepas GR4fadD o Rm1021 (figura 3).

Aunque los resultados obtenidos son interesantes ya que indican que en *S. meliloti* *cheA* no es esencial para la movilidad en superficie, el hecho de que los

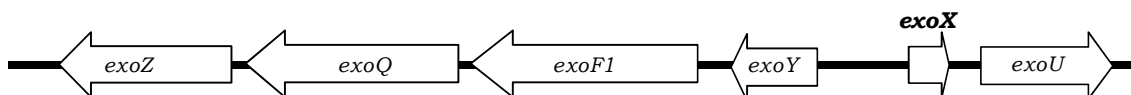
distintos mutantes *cheA* muestren un comportamiento en superficie similar al de sus correspondientes cepas parentales, nos llevó a abandonar una caracterización más profunda de los mismos.



**Figura 3.** Fotografías representativas de la movilidad en superficie de distintas cepas de *S. meliloti* delecionadas en el gen *cheA* y sus correspondientes cepas parentales, así como del transposante SPS324 (1021FDCSS*cheA*::Tn5). Se muestra el valor medio del halo de expansión medido en milímetros de al menos tres experimentos independientes con un mínimo de tres réplicas técnicas junto con el error típico con un nivel de confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ). Las medidas se realizaron a las 24 horas de incubación, mientras que las imágenes fueron tomadas tras consolidación de la colonia.

### 2.1.2 Caracterización fenotípica de mutantes de *S. meliloti* delecionados en el gen *exoX* (*smb20947*).

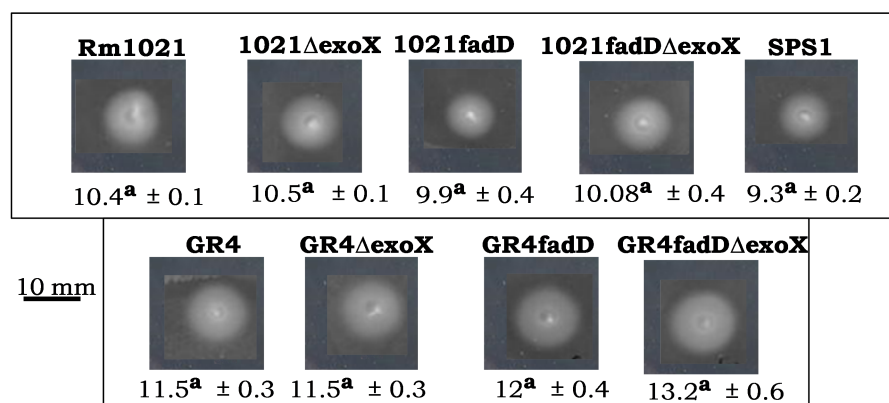
El gen *exoX* se identificó en este trabajo como el gen afectado por la inserción de Tn5 en el transposante SPS1 (1021FDCSS*exoX*::Tn5), mutante caracterizado por presentar una movilidad *swimming* similar a la de la cepa parental pero mayor translocación en superficie. El gen *exoX* (figura 4) codifica potencialmente una proteína de 98 aas y su inactivación causa en *S. meliloti* la súper-producción del EPS I de bajo peso molecular (Reed *et al.*, 1991). Se postula que el efecto inhibitor de ExoX sobre la síntesis de EPS I ocurre mediante un mecanismo post-traducciona en el que la estequiometría con ExoY, una transferasa de azúcares requerida en la síntesis del polisacárido, parece ser importante.



**Figura 4.** Contexto genómico del gen *exoX* (*smb20947*) en *S. meliloti* Rm1021. ExoU y ExoY glucosil-transferasa y galactosil-transferasa para la síntesis de EPS. ExoF1, proteína periplásmica involucrada en la exportación de polisacáridos, ExoQ, una putativa polimerasa de polisacáridos y ExoZ, acetiltransferasa.

#### 2.1.2.1 Movilidad

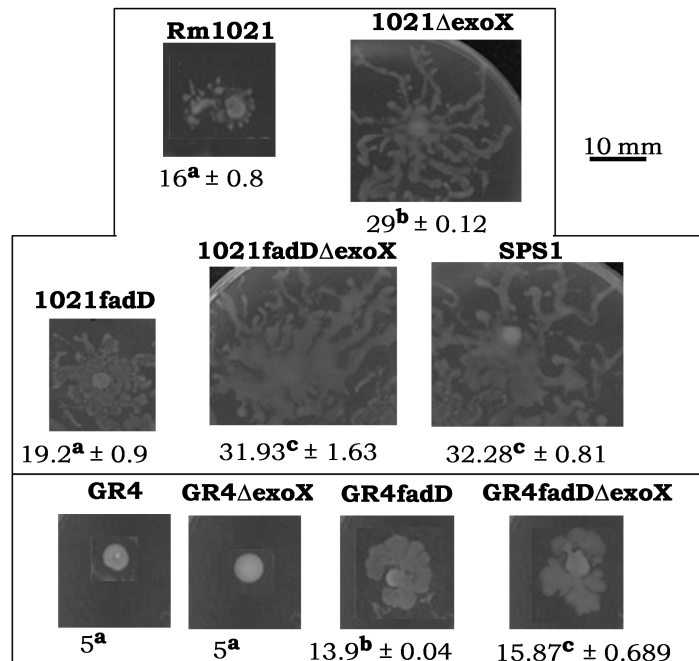
Los ensayos de movilidad *swimming* revelaron que al igual que lo observado para el transposante SPS1 (1021FDCSS(*exoX*::Tn5)), la deleción del gen *exoX* no afectaba significativamente este tipo de movilidad en ninguno de los fondos genéticos ensayados (figura 5).



**Figura 5.** Fotos representativas de movilidad *swimming* tras 48 h de incubación de cepas de *S. meliloti* delecionadas en el gen *exoX*, sus correspondientes cepas parentales, y el transposante SPS1 (1021FDCSS*exoX*::Tn5). Bajo cada imagen se indica el halo medio de expansión y el error típico medido en milímetros de dos experimentos independientes con un mínimo de dos réplicas técnicas. Letras idénticas

indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

Los ensayos de movilidad en superficie permitieron comprobar que la delección del gen *exoX* induce hipermovilidad en superficie tanto en Rm1021 como en 1021fadD, reproduciendo así el comportamiento observado en el transposante SPS1 (figura 6). Por el contrario, la delección del gen *exoX* no tuvo efecto alguno en las cepas GR4 o GR4fadD (figura 6). Por tanto, la delección de *exoX* promueve la movilidad en superficie en el fondo de Rm1021 pero no en GR4.

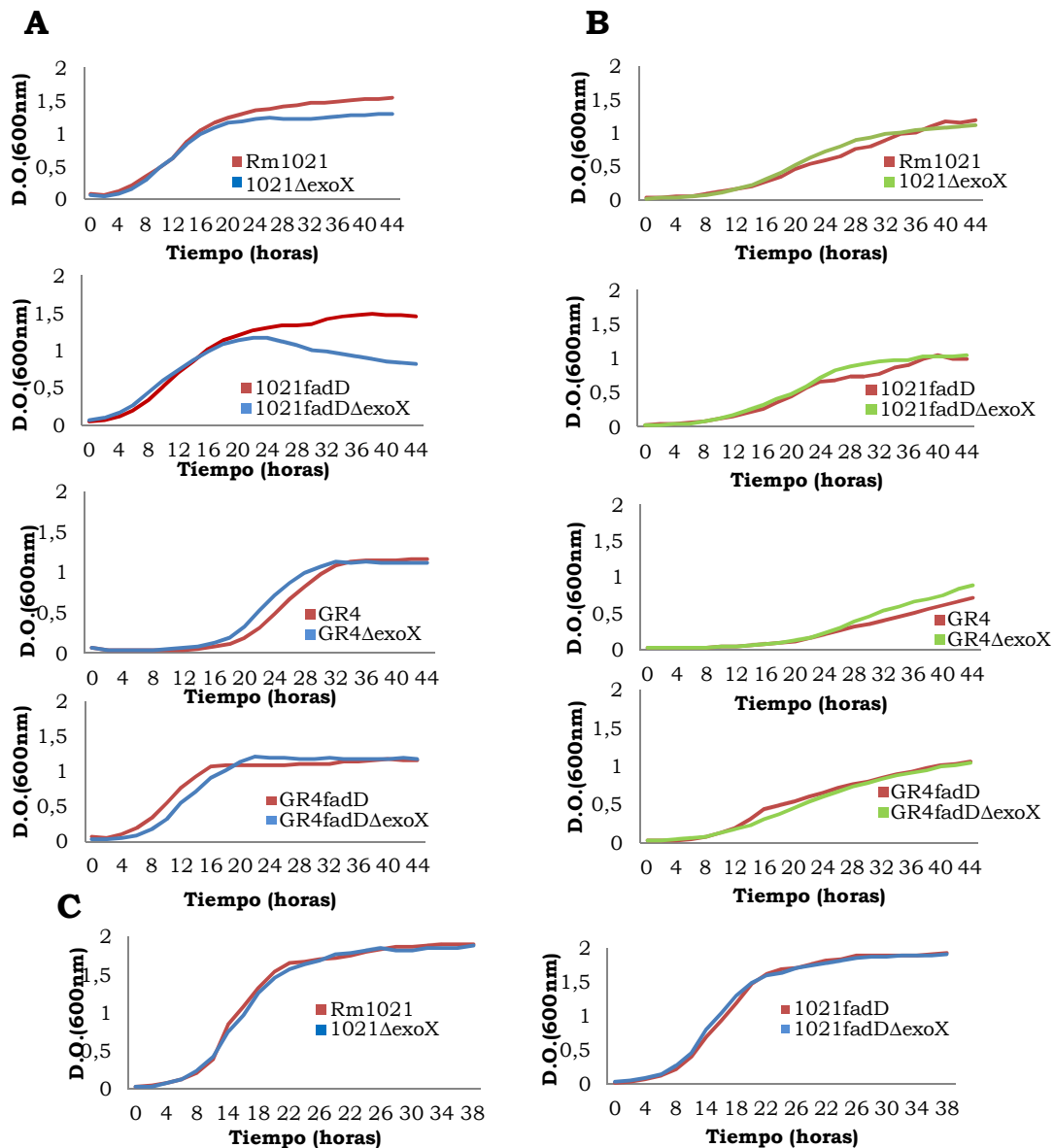


**Figura 6.** Fotografías representativas de la movilidad en superficie de distintas cepas de *S. meliloti* delecionadas en el gen *cheA* y sus correspondientes cepas parentales, así como del transposante SPS1 (1021FDCSS*exoX*::Tn5). Se indica el valor medio del halo de expansión medido en milímetros de al menos tres experimentos independientes con un mínimo de tres réplicas técnicas junto con el error típico con un nivel de confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ). Las medidas se realizaron a las 24 horas de incubación, y las imágenes se tomaron tras consolidación de la colonia.

### 2.1.2.2 Crecimiento

Con el fin de saber si la delección *exoX* afectaba al crecimiento bacteriano, se realizaron curvas de crecimiento de los distintos mutantes tanto en medio rico TY como en MM, y se compararon con las mostradas por las correspondientes cepas parentales. En medio mínimo no se apreciaron diferencias de crecimiento en ninguno de los fondos genéticos (figura 7B). En TY, tal y como se muestra en la figura 7, no se observaron diferencias de crecimiento en los fondos de GR4 y GR4fadD (fig. 7A), pero sí se veían algunas diferencias en los mutantes 1021 $\Delta$ exoX y 1021fadD $\Delta$ exoX al llegar a la fase estacionaria (fig. 7A).

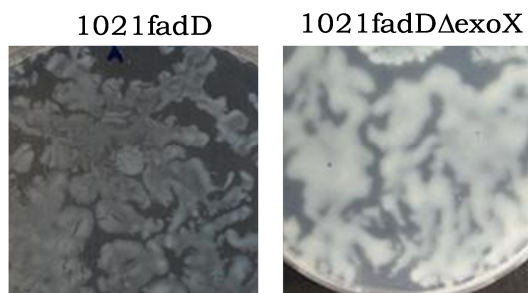
No obstante, cuando las curvas de crecimiento se repitieron con cultivos crecidos en tubos de ensayo, las diferencias desaparecieron (fig. 7 C). Pensamos que este diferente comportamiento podría ser causado por una mayor producción de EPS I en las cepas 1021 $\Delta$ exoX y 1021fadD $\Delta$ exoX que podría dar lugar a una precipitación o adsorción de células a las paredes en cultivos que no tienen una buena agitación como puede ocurrir con el uso de Bioscreen.



**Figura 7.** Curvas de crecimiento en (A) medio TY y (B) MM de distintos mutantes delecionados en el gen *exoX* y sus correspondientes cepas parentales. En A y B las curvas se realizaron utilizando Bioscreen, mientras que las gráficas mostradas en C representan curvas de crecimiento en TY realizadas en tubos de vidrio.

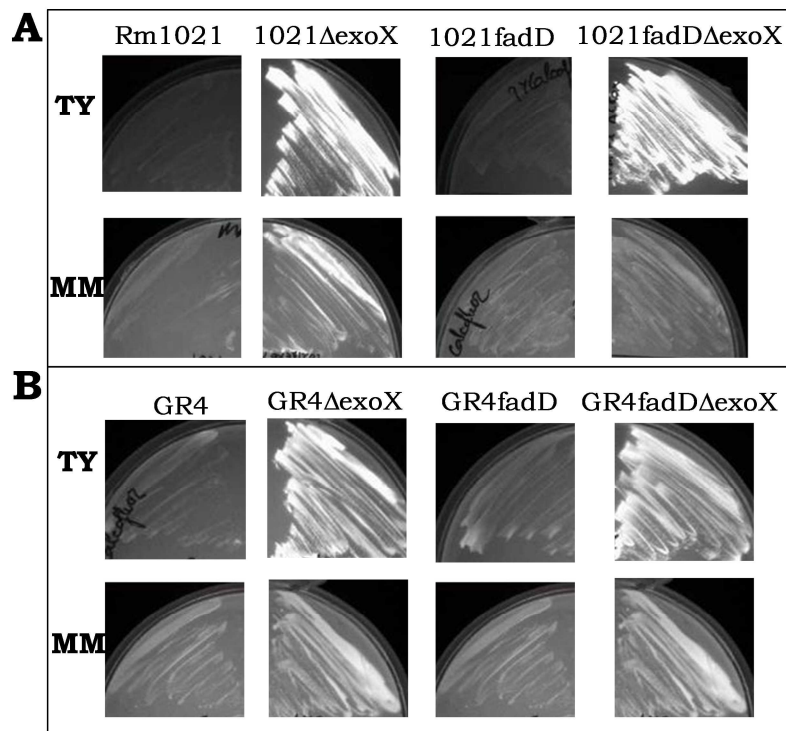
### 2.1.2.3 Mucosidad y fluorescencia en placas con calcoflúor

Como se mencionó en el capítulo I, el transposante SPS1 mostraba un aspecto mucoso, probablemente consecuencia de la mayor producción de EPS I causada por la inactivación del gen *exoX*. Al igual que SPS1, los distintos mutantes obtenidos por delección en *exoX* también mostraron un aspecto mucoso (figura 8).



**Figura 8.** Comparación del aspecto mucoso mostrado por el mutante 1021fadDΔ*exoX* con respecto a la cepa parental 1021fadD tras crecimiento en MM semisólido. Fotos tomadas tras 48h de incubación. Las distintas cepas delecionadas en *exoX* obtenidas en este estudio presentan un fenotipo mucoso similar al mostrado por 1021fadDΔ*exoX*.

El EPS I de *S. meliloti* es un polisacárido ácido capaz de unirse a calcoflúor por lo que su presencia puede ser detectada como fluorescencia emitida por las colonias tras ser iluminadas con luz ultravioleta (Zhan and Leigh, 1990). Para comprobar si la delección del gen *exoX* realmente causaba un incremento en los niveles de EPS I, los distintos mutantes se crecieron en placas de TY y MM adicionadas con calcoflúor. Como se muestra en la figura 9, todos los mutantes delecionados en *exoX* emitieron mayor fluorescencia al ser iluminados con luz ultravioleta (uv) que sus correspondientes cepas parentales, aunque en medio mínimo no fue tan evidente esta diferencia. Este resultado sugiere que independientemente del fondo genético, la delección del gen *exoX* causa un incremento en los niveles de EPS I.



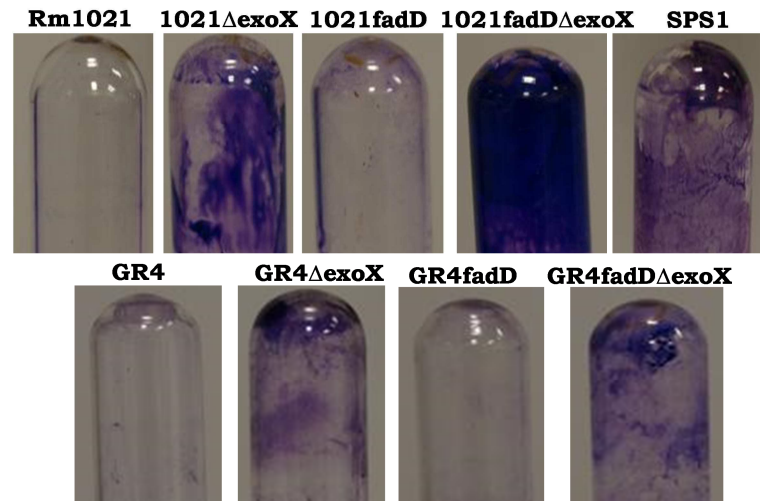
**Figura 9.** Fluorescencia emitida por distintas cepas de *S. meliloti* Rm1021 (A) y GR4 (B) crecidas en placas de TY y MM conteniendo calcoflúor (0.02%) tras ser iluminadas con luz uv. Las placas se crecieron durante 3 días.

#### 2.1.2.4 Formación de biopelículas

Dada la estrecha conexión existente entre movilidad *swarming* y formación de biopelículas en otras bacterias, se decidió analizar la capacidad de formación de biopelículas de los distintos mutantes y sus cepas parentales tanto en tubos de vidrio como en placas multipocillo de PVC. La formación de biopelículas en tubo de vidrio se analizó en cultivos bien crecidos ( $DO \geq 1.5$ ) en MM tras dejarlos durante 24 ó 48 horas en condiciones estáticas. Los resultados más llamativos se obtuvieron a los dos días.

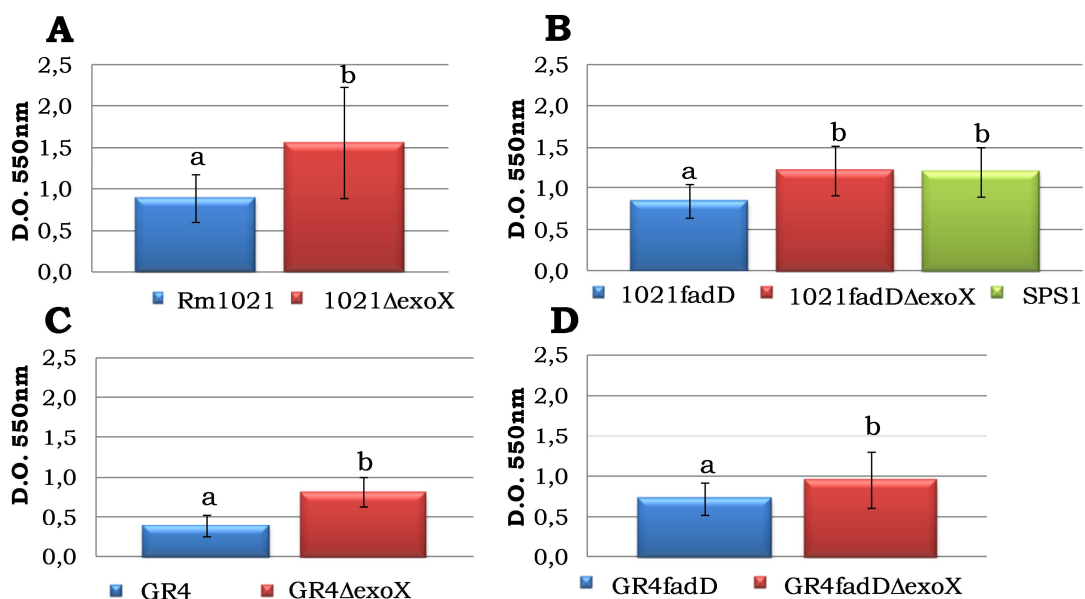
Tras la tinción con cristal violeta, pudimos apreciar que, independientemente del fondo genético, una delección en el gen *exoX* incrementaba significativamente la capacidad de formar biopelículas (fig.10). No obstante, el efecto parecía ser más notable en los mutantes delecionados derivados de Rm1021 que en los de GR4, detectándose la mayor formación de biopelícula en 1021fadDΔexoX.





**Figura 10.** Formación de biopelícula en tubo de vidrio de los mutantes *exoX* y sus correspondientes cepas de referencia, tras 48h de incubación estática a 28°C y posterior tinción con cristal violeta.

La formación de biopelícula en placas multipocillo se cuantificó directamente a las 48h de incubación estática en MM. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 11.

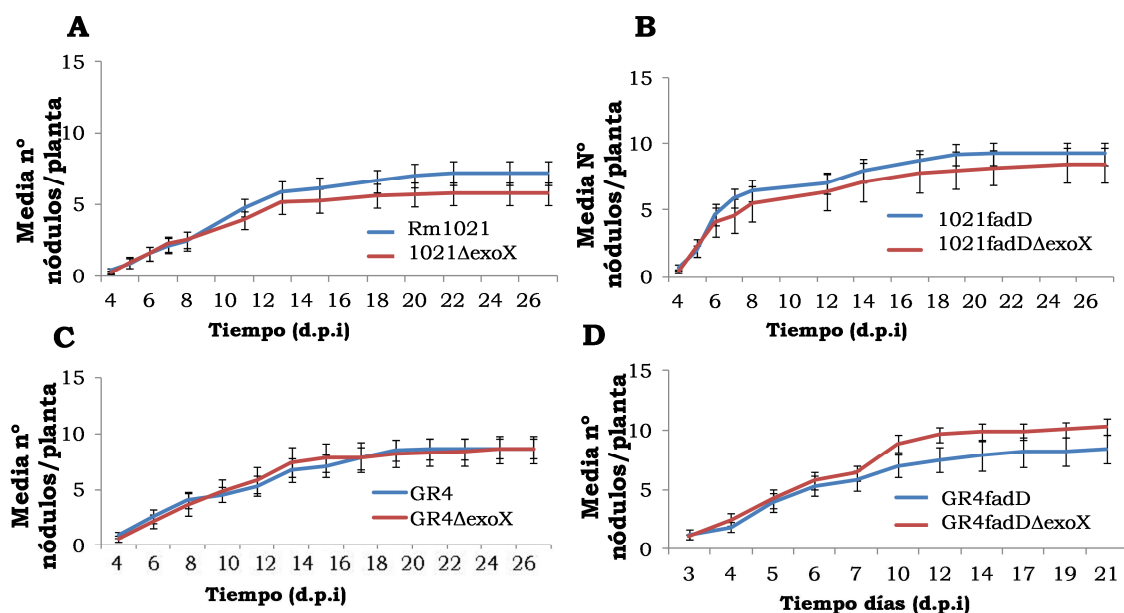


**Figura 11.** Efecto del gen *exoX* en la capacidad de formar biopelículas en placas de PVC en las cepas de *S. meliloti* Rm1021 (A), 1021fadD (B), GR4 (C) y GR4fadD (D). En el gráfico B se muestra también la cantidad de biopelícula formada por el transposante SPS1 (1021FDCSS*exoX*::Tn5). Las barras representan la desviación estándar de la media de un total de 20 medidas realizadas por cepa en cuatro experimentos independientes. Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

Al cuantificar la cantidad de biopelícula adherida a una superficie sólida mediante esta técnica hemos confirmado los resultados anteriores en tubo de vidrio, ya que la producción de biopelícula de los mutantes delecionados en *exoX* en los cuatro fondos genéticos es significativamente superior a la producida por las cepas parentales (figura 11).

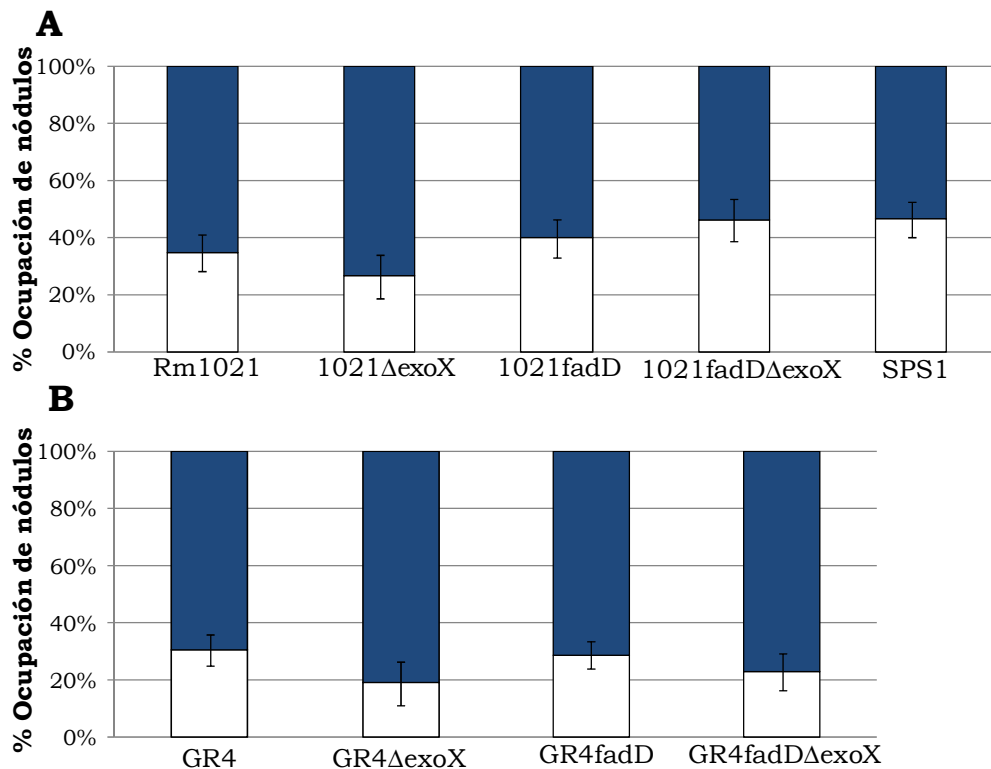
### 2.1.2.5 Fenotipo simbiótico

Los ensayos de nodulación realizados en plantas de alfalfa han demostrado que todos los mutantes delecionados en el gen *exoX* son capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno. Además, se observó que la capacidad infectiva de los mutantes 1021 $\Delta$ *exoX* y 1021*fadD* $\Delta$ *exoX* era similar a la mostrada por las correspondientes cepas parentales (figura 12 A y B)). Lo mismo ocurre con los mutantes *exoX* en el fondo genético GR4 y en su derivado *fadD* (figura 12 C y D).



**Figura 12.** Eficiencia de nodulación en *M. sativa* de mutantes delecionados en el gen *exoX* en distintos fondos de *S. meliloti*. Se muestra el fenotipo simbiótico representativo exhibido por los mutantes en al menos dos experimentos. En cada gráfica se compara el número medio de nódulos por planta formados por cada mutante con respecto al formado por las diferentes cepas parentales. Cada punto es la media de 20 plantas. Las barras representan el error estándar con un intervalo de confianza del 95%.

En los ensayos de competitividad tampoco se detectaron diferencias significativas en la capacidad competitiva por la ocupación de nódulos entre las cepas delecionadas y sus correspondientes cepas parentales (fig. 13).



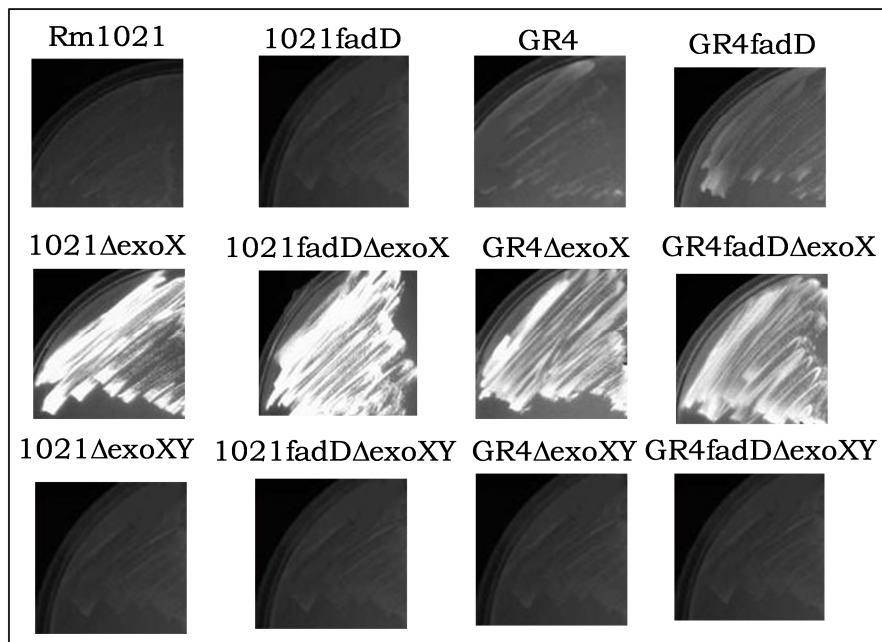
**Figura 13.** Porcentaje medio de ocupación de nódulos de los mutantes derivados de Rm1021 (A) y GR4 (B) tras inocular con la cepa 1021(pGUS3) o GR4(pGUS3) portadoras del plásmido (pGUS3) en una proporción 1:1. Tras la incubación con X-Gluc, los nódulos ocupados por la cepa parental portadora del plásmido se tiñen de azul; su porcentaje de ocupación es representado también con dicho color. Se muestra la media y el error estándar obtenidos de 24 plantas en dos experimentos independientes con un nivel de confianza del 95%.

#### 2.1.2.6 Construcción y caracterización de dobles mutantes en los genes *exoX* (*smb20947*) y *exoY* (*smb20946*).

Como se ha descrito en la Introducción de este trabajo, los polisacáridos superficiales bacterianos se han implicado tanto en movilidad *swarming* como en la formación de biopelículas. El aspecto mucoso así como la fluorescencia emitida por las cepas de *S. meliloti* delecionadas en *exoX* son fenotipos que sugieren que, tal y como se describe en la bibliografía (Reed *et al.*, 1991) estos mutantes producen mayores cantidades de EPS I. Para analizar si los fenotipos de mayor movilidad en superficie y mayor capacidad de formar biopelículas asociados a mutantes *exoX* de *S. meliloti* estaban relacionados con el incremento en los niveles de EPS I, o eran el resultado de cualquier otro posible efecto causado por ExoX, decidimos obtener y caracterizar el comportamiento de mutantes incapaces de producir EPS I. Estos mutantes se obtuvieron introduciendo una deleción en el gen *exoY* que codifica una galactosiltransferasa que participa en las primeras etapas de síntesis del

succinoglucano. La estrategia para la construcción de los mutantes *exoY* se detalla en el Anexo 2.2.

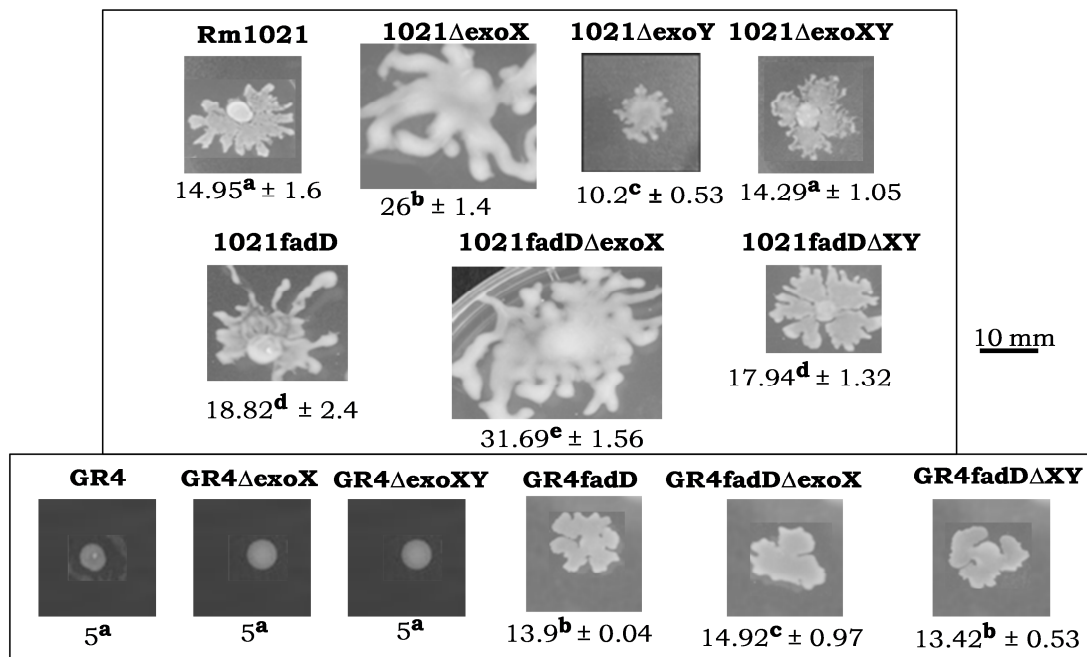
La prueba fenotípica de que realmente habíamos seleccionado mutantes *exoY* se obtuvo tras crecerlos en placas de TY calcoflúor (0.02%) e irradiarlos con luz UV, ya que ninguno de ellos emitió fluorescencia (figura 14). Además, los dobles mutantes *exoX-exoY* no presentan el aspecto mucoso tan característico observado en los mutantes simples *exoX* (datos no mostrados).



**Figura 14.** Fluorescencia emitida por distintas cepas y mutantes de *S. meliloti* crecidas en medio TY conteniendo calcoflúor (0.02%) tras ser iluminadas con luz uv. Las placas se crecieron durante 3 días.

Ensayos de movilidad *swimming* pusieron de manifiesto que la inactivación del gen *exoY*, o lo que es lo mismo, la incapacidad de producir EPS I, no altera este tipo de movimiento en las distintas cepas ensayadas (datos no mostrados). La mutación *exoY* tampoco alteró el comportamiento en superficie de las cepas GR4Δ*exoX* y GR4fadDΔ*exoX* (figura 15). Por el contrario, la mutación *exoY* anuló la hipermovilidad en superficie mostrada por los derivados *exoX* de Rm1021, alcanzando valores similares a los mostrados por sus correspondientes cepas parentales. Estos resultados sugieren que la súper-producción de EPS I causada por la inactivación del gen *exoX*, facilita la translocación en superficie de cepas derivadas de Rm1021, pero no en GR4. Por otro lado, el similar desplazamiento en superficie mostrado por el doble mutante 1021Δ*exoXY* y Rm1021 sugiere que la producción de niveles normales de EPS I no es esencial en la movilidad en superficie de *S. meliloti*,

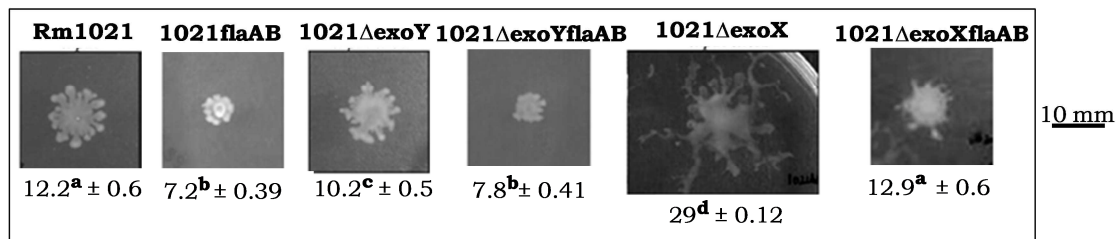
hipótesis que se confirma con el comportamiento en superficie mostrado por el simple mutante deficiente en succinoglucano 1021 $\Delta$ exoY (fig. 16)



**Figura 15.** Ensayo de movilidad en superficie de distintas cepas de *S. meliloti* en el que se muestra el efecto de deleciones en el gen *exoX*, o una doble deleción *exoXexoY* en fondos silvestre y mutante *fadD* de las cepas Rm1021 y GR4. Se muestran las fotos representativas de cada uno de ellos junto con la media y el error estándar de tres experimentos independientes compuestos por tres réplicas técnicas, medido en milímetros. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

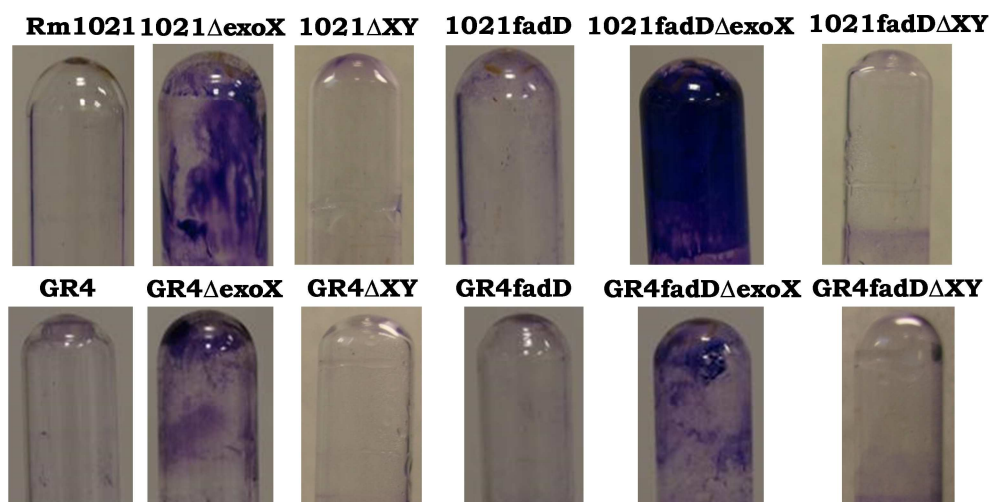
Investigaciones realizadas en el grupo indicaban que la cepa Rm1021 era capaz de desplazarse en superficie utilizando mecanismos dependientes e independientes de acción flagelar (Nogales *et al.*, 2012). Con objeto de analizar si el mayor desplazamiento en superficie mostrado por el mutante *exoX* derivado de Rm1021 era consecuencia de la estimulación de *swarming*, de una movilidad independiente de flagelos, o de ambas, se obtuvo el derivado aflagelado de 1021 $\Delta$ exoX mediante transducción de la mutación *flaAflaB* de la cepa 1021flaAB, y se analizó su comportamiento en ensayos de movilidad en superficie. Como se observa en la figura 16, la ausencia de flagelos disminuyó drásticamente el desplazamiento en superficie del mutante *exoX*, aunque seguía presentando mayor translocación que el derivado aflagelado de Rm1021 (1021F) y del mutante *exoY*. Estos resultados indican que mientras la producción de niveles normales de EPS I no desempeña un papel relevante en la translocación en superficie de Rm1021, la súper-producción de este polisacárido generada por una mutación *exoX* promueve tanto *swarming* como

un desplazamiento independiente de flagelos. Estos resultados forman parte de la publicación Nogales *et al.*, 2012.



**Figura 16.** Ensayo de movilidad en superficie de distintas cepas de *S. meliloti* en el que se muestra el efecto de la delección *flaAflaB* (F) en la cepa silvestre y en los mutantes *exoX* y *exoY* de Rm1021. Se muestran las fotos representativas de cada uno de ellos junto con la media (en milímetros) y el error estándar de tres experimentos independientes compuestos por tres réplicas técnicas. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

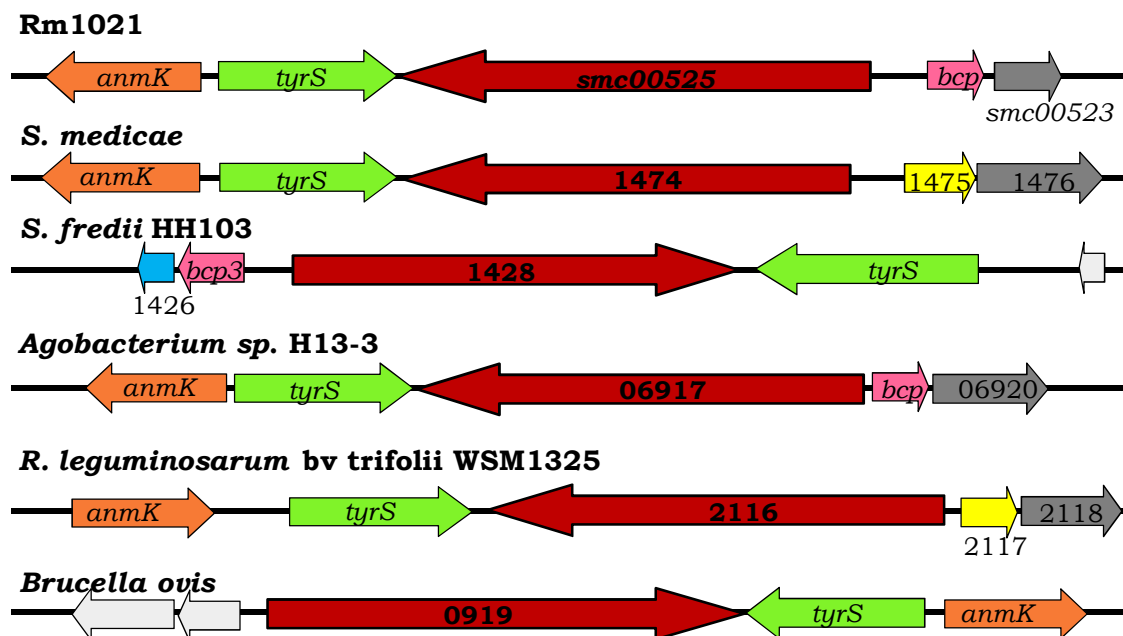
De forma análoga, comprobamos la capacidad de los mutantes delecionados en los genes *exoX* y *exoY* de formar biopelícula en tubo de vidrio a las 48 horas de incubación estática en MM. Los resultados obtenidos revelaron la drástica reducción en formación de biopelícula (fig. 17), esto indica que al igual que el fenotipo de hipermovilidad, el incremento de biopelícula sobre superficie de vidrio observado en estas cepas, es debido a la súper-producción de EPS I.



**Figura 17.** Formación de biopelícula en tubo de vidrio tras 48h de incubación estática y posterior tinción con cristal violeta de mutantes *exoX* y dobles mutantes *exoXY* de *S. meliloti*.

**2.1.3 Caracterización fenotípica de mutantes de *S. meliloti*-deleccionados en el gen *smc00525*.**

El gen *smc00525* se identificó en este trabajo como el gen afectado por la inserción de Tn5 en el transposante GSPS51 (GR4FDCSS*smc00525*::Tn5), mutante caracterizado por presentar una movilidad *swimming* similar a la de la cepa parental pero mayor translocación en superficie. El producto de 1138 aminoácidos codificado por el gen *smc00525* ha sido anotado como una hipotética proteína transmembrana de función desconocida, proteína que parece estar muy conservada en otros rizobios. Así, se identifican proteínas prácticamente idénticas en distintas cepas de *S. meliloti* (99% identidad (I)) y *S. medicae* (91% I), y muy parecidas en cepas de *S. fredii* (78% I), *R. etli* (46% I) o *R. leguminosarum* biovar *viciae* (45% I). Además, como se aprecia en la fig. 18, el contexto genómico en el que se encuentra el gen *smc00525* parece estar bastante conservado entre distintos miembros del orden Rhizobiales, destacando la presencia del gen *tyrS* que codifica una tyrosyl-tRNA sintetasa y *bcp* que codifica una proteína que comigra con bacterioferritina (*bcp*) que podría funcionar como peroxirredoxina.



**Figura 18.** Contexto genómico de *smc00525* y diferentes ortólogos ■ en distintos miembros del orden Rhizobiales. *tyrS* ■ codifica una tyrosyl-tRNA sintetasa; *bcp* ■, gen que codifica una proteína que comigra con bacterioferritina; *anmK* ■ codifica una putativa quinasa ácida de N-acetylmurámico anhidro; ■ genes que codifican una hidroperóxido reductasa; ■ rhamnosyltransferasa; ■ genes de función aún desconocida; ■ Otros genes.



Un análisis *in silico* de la proteína revela la presencia de un dominio transmembrana entre los aminoácidos 54-76, así como un dominio de unión a ATP, típico de proteínas quinasa (región 98-122) (figura 19). Además al utilizar el programa BLASTP de NCBI se identifica la presencia de 3 dominios conservados: El dominio TIGR02099 que se extiende a lo largo de la mayor parte de la proteína, entre los aminoácidos 387-950, perteneciente a una familia de proteínas de gran tamaño presentes en Proteobacterias; el dominio DUF3971 en la región 477-701, presente en una familia de proteínas de función desconocida, y que están muy relacionadas con proteínas de la familia AsmA; en el extremo C-terminal comprendiendo los aminoácidos 901-116 se identifica una región AsmA-like, similar al C-terminal de la proteína AsmA de *E. coli* (fig. 19). Esta región C-terminal es precisamente la más conservada entre los distintos ortólogos de *smc00525*. En *E. coli*, AsmA se ha implicado en evitar el plegamiento erróneo de proteínas de membrana externa (OMPs), aunque el papel exacto no se conoce (Deng and Misra, 1996). En *Salmonella*, AsmA es una OMP cuya ausencia confiere resistencia a la bilis y menor capacidad invasiva de células epiteliales (Prieto *et al.*, 2009).



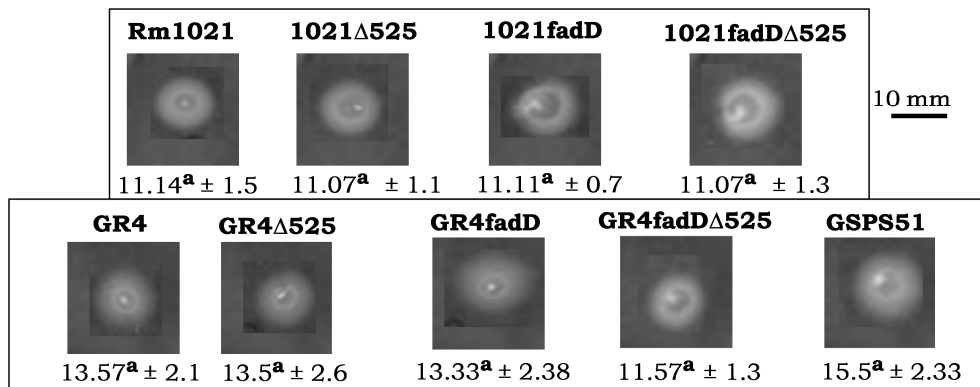
**Figura 19.** Esquema de los dominios presentes en la proteína *smc00525*. ■ Dominio transmembrana. ■ Sitio de unión a ATP típico de proteínas-quinasa. ■ Dominio presente en una familia de proteínas de gran tamaño, de unos 1250 aminoácidos de Proteobacterias. ■ Dominio DUF3971 y ■ dominio AsmA.

#### 2.1.3.1 Movilidad

Como ha sido comentado anteriormente, el transposante GSPS51 afectado en el gen *smc00525*, mostró mayor movilidad en superficie en placas de MM semisólido que la cepa GR4fadD de la que deriva y una movilidad *swimming* similar a la de la cepa parental.

Los ensayos de movilidad *swimming* han revelado que no existen diferencias significativas en este tipo de movilidad entre mutantes delecionados en *smc00525* y sus correspondientes cepas parentales (figura 20).

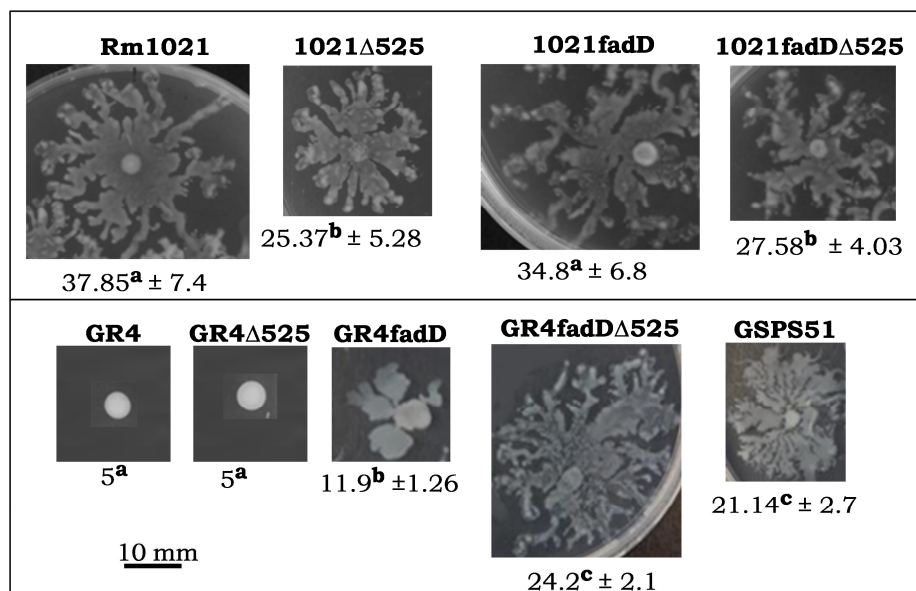




**Figura 20.** Ensayos de movilidad *swimming* de distintas cepas de *S. meliloti* delecionadas en el *gen smc00525* y sus correspondientes cepas parentales, así como del transposante GSPS51 (GR4FDCSS*smc00525*::Tn5). Bajo cada foto representativa se indica el valor medio de dispersión en milímetros de cada cepa tras 48 h de incubación, obtenido de al menos tres experimentos independientes con al menos dos réplicas técnicas. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

A) Movilidad en superficie en MM 0.6% agar Pronadisa

En la figura 21 se muestran fotos representativas de la movilidad en superficie mostrada por las distintas cepas delecionadas en el *gen smc00525* y sus correspondientes cepas parentales. Como se puede observar, la deleción de este *gen* no induce la aparición de movilidad en la cepa GR4. Por el contrario, en un fondo *fadD* de GR4 sí favorece una mayor movilidad, corroborándose el fenotipo observado para el transposante GSPS51 (fig. 21).



**Figura 21.** Ensayo de movilidad en superficie de distintas cepas de *S. meliloti* donde se muestran las fotos representativas de mutantes *smc00525* y sus correspondientes cepas parentales tras 24 horas de incubación y posterior consolidación de la colonia. Bajo cada foto representativa, se indica el valor medio de expansión de la colonia de al menos tres experimentos independientes compuestos de un mínimo de tres réplicas técnicas, junto con el error típico con un nivel de confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

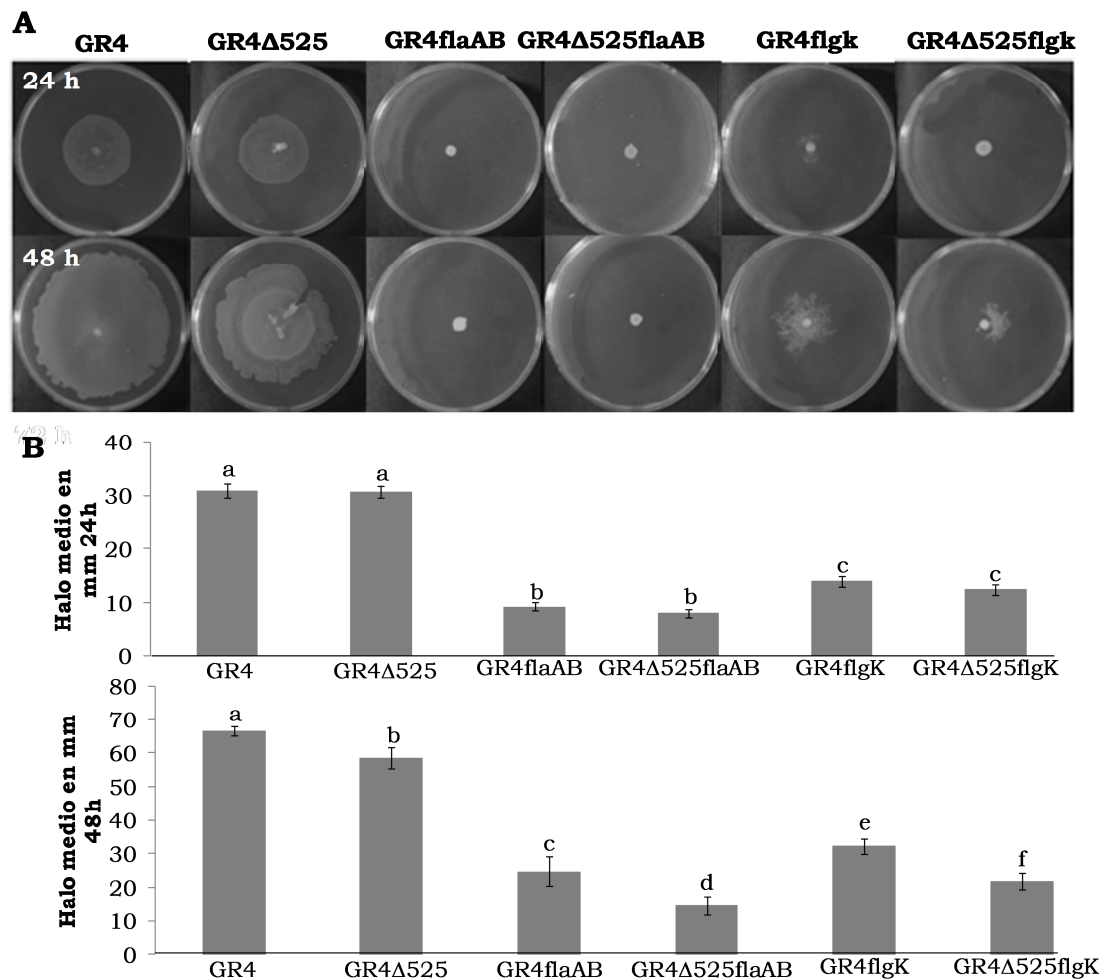
Los ensayos de movilidad en superficie en las cepas derivadas de Rm1021 revelan que la delección del gen *smc00525* tiende a reducir ligeramente, aunque de manera significativa la translocación en superficie de Rm1021 y de 1021fadD (figura 21).

#### B) Movilidad en superficie en MM 0.6% agar noble (AN)

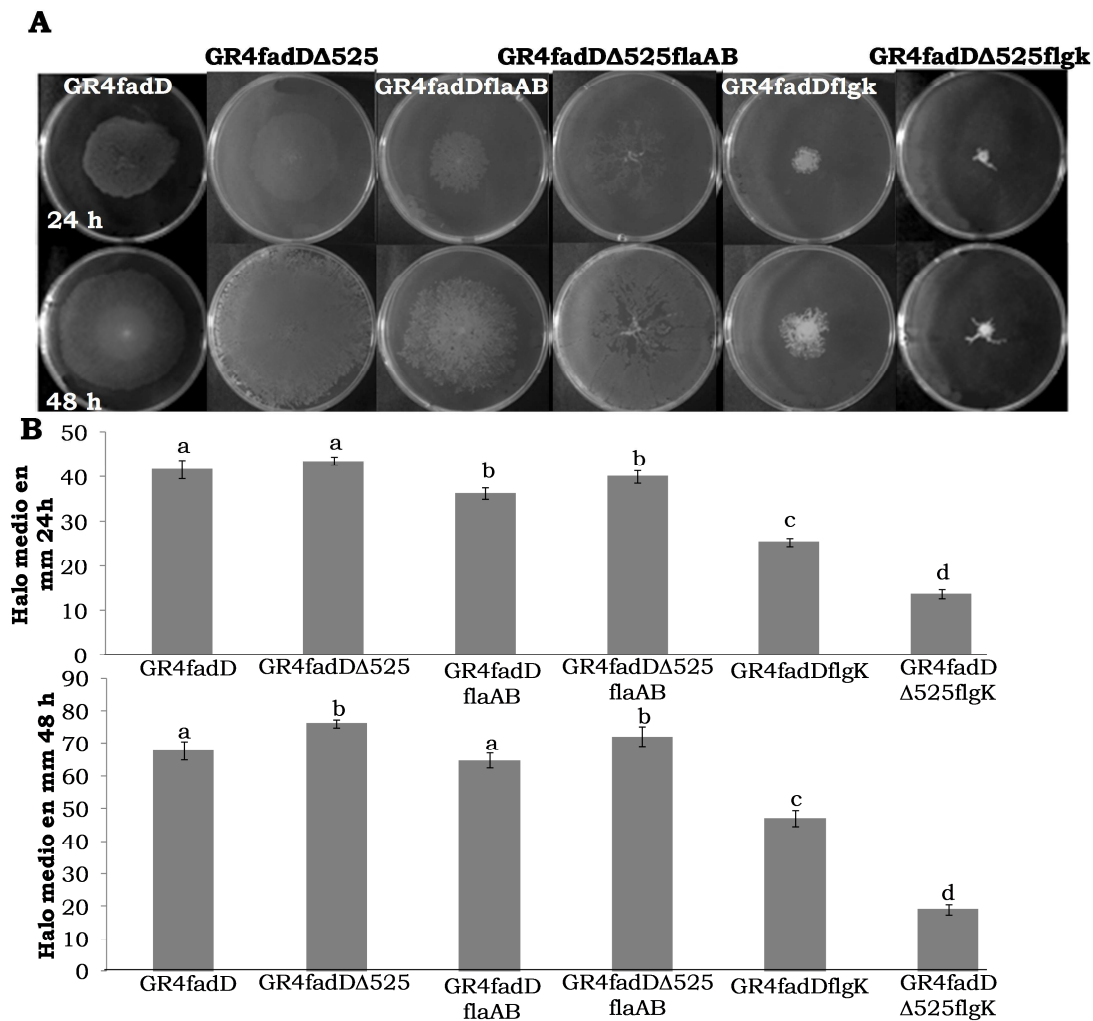
Durante la caracterización de estos mutantes hubo que cambiar las condiciones de ensayo de movilidad en superficie. El agar Pronadisa fue sustituido por agar noble de Difco (AN) como agente solidificante. Este nuevo agar empleado en medio mínimo a una concentración de 0.6% induce en GR4 una movilidad absolutamente dependiente de flagelos (*swarming*) (ver más detalles en capítulo 3). En este punto y a diferencia de *exoX*, la caracterización de *smc00525* no estaba publicada, por lo que fue necesario estudiar su comportamiento en las nuevas condiciones de ensayo centrando nuestra atención en el fondo GR4. Por otro lado, en ese momento ya éramos conscientes de la existencia de *sliding* en *S. meliloti*, por lo que se incluyeron los mutantes aflagelados (*flaAflaB*, *flgk*) tanto en el fondo silvestre como en un fondo *fadD* de GR4.

Como podemos observar en la figura 22, la movilidad mostrada tanto por GR4 como por el mutante GR4Δ525 es principalmente dependiente de acción flagelar, ya que los correspondientes derivados aflagelados (GR4flaAB y GR4Δ525flaAB) pierden totalmente la capacidad de desplazamiento en superficie. Además, las nuevas condiciones experimentales permitieron poner de manifiesto que la delección del gen *smc00525* provoca una reducción significativa en la movilidad *swarming* de GR4, apreciable especialmente tras 48 y 72 horas de incubación. La ausencia de *smc00525* también parece disminuir la movilidad independiente de flagelo característica de un mutante *flgK* (ver detalles en capítulo 3). Por otro lado, aunque el resultado es menos llamativo que el obtenido con agar Pronadisa, hemos podido comprobar que en un fondo mutante *fadD* de GR4, la ausencia de *smc00525* favorece ligeramente la expansión de la colonia a partir de las 48h de incubación (figura 23). Como se discutirá con más detalle en el capítulo 3, la movilidad mostrada en superficie por la cepa GR4fadD es mediada mayoritariamente por un mecanismo independiente de acción flagelar como así lo indica la escasa diferencia en desplazamiento mostrado por GR4fadD y el derivado aflagelado GR4fadDflaAB (fig. 23). El comportamiento en superficie del mutante

aflagelado GR4fadDΔ525flaAB indica que la pérdida de función de *smc00525* promueve el movimiento independiente de flagelos mayoritario de la cepa GR4fadD. Curiosamente, en el fondo GR4fadD, la delección de *smc00525* interfiere drásticamente con la puesta en marcha de la movilidad independiente de flagelo característica de un mutante *flgK* como así lo refleja el comportamiento del mutante GR4fadDΔ525flgK (figura 23).



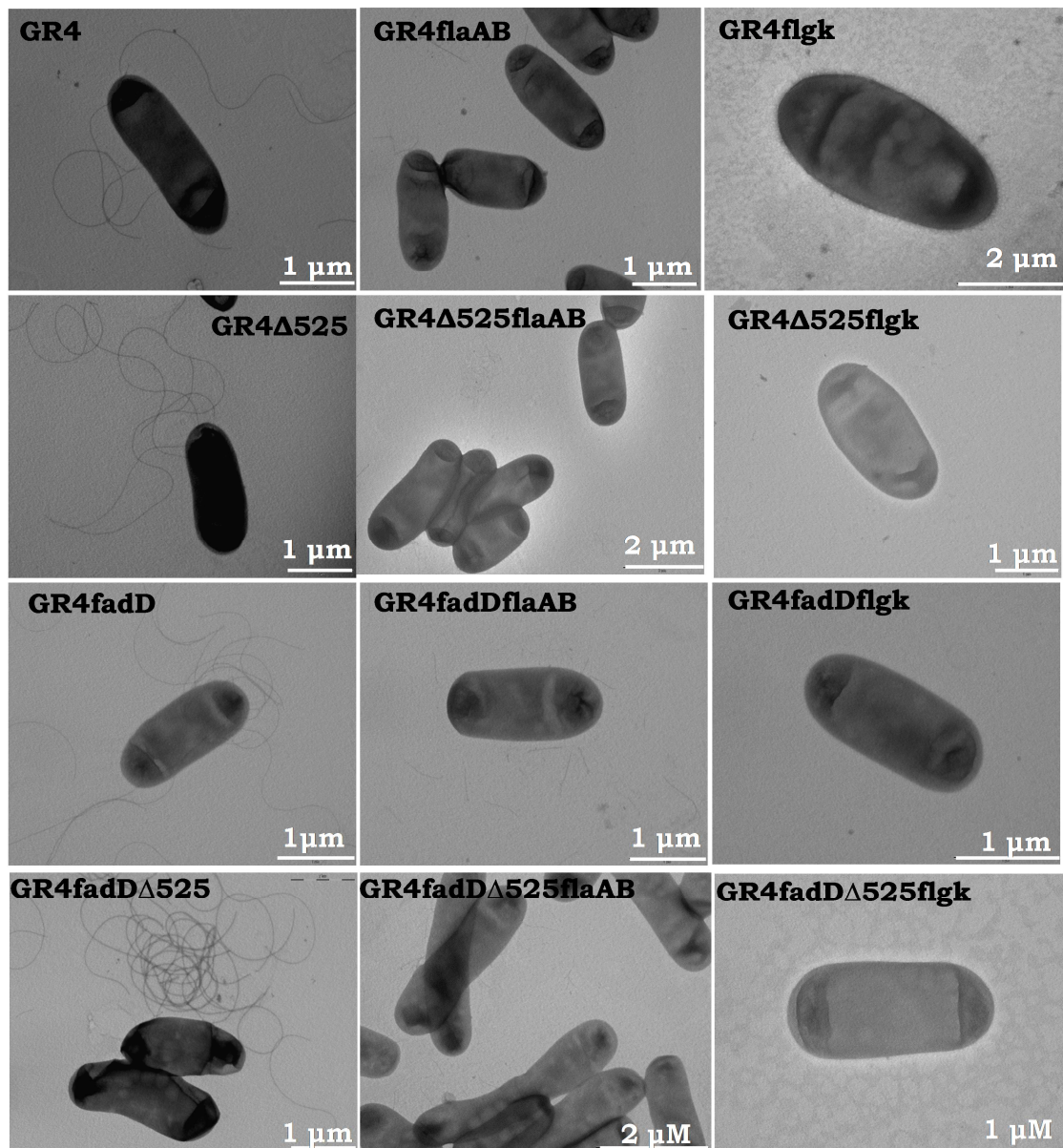
**Figura 22.** (A) Secuencia fotográfica representativa de la translocación media a lo largo del tiempo, 24 y 48 horas de incubación, de distintos mutantes derivados de GR4. En B, se representa la expansión media en milímetros de cada una de las cepas bacterianas obtenida tras tres ensayos de movilidad independientes con al menos tres réplicas técnicas a distintos intervalos de tiempo de incubación. Las barras representan el error típico con un nivel de confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ).



**Figura 23.** (A) Secuencia fotográfica representativa de la translocación media de cada una de las cepas ensayadas a lo largo del tiempo (24 y 48 horas de incubación). (B) Expansión media en milímetros de cada una de las cepas bacterianas obtenida tras tres ensayos de movilidad independientes con un mínimo de tres réplicas técnicas a distintos intervalos de tiempo de incubación. Las barras representan el error típico con un nivel del confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

### 2.1.3.2 Visualización al microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Con el objetivo de poder interpretar correctamente las diferencias en el comportamiento móvil de los distintos mutantes derivados de la cepa GR4, se llevó a cabo la visualización en microscopio electrónico de transmisión de las distintas cepas. Esto nos permitiría confirmar la presencia/ausencia de flagelos, variación en el n° de flagelos, así como cualquier otro tipo de alteración morfológica que pudiese explicar un distinto comportamiento móvil. Las muestras para la observación se obtuvieron de células crecidas en placas de MM 0.6% AN, tras 20h de incubación a 28°C (figura 24).



**Figura 24.** Morfología al microscopio electrónico de transmisión de distintos mutantes derivados de la cepa GR4 de *S. meliloti*. Las células se tomaron del borde de colonias crecidas en MM (0.6%) durante 20 horas

Como resultado de esta visualización pudimos comprobar que:

1. En las nuevas condiciones experimentales, la mutación *fadD* incrementa el número de flagelos por célula (ver tabla 1), si bien dicho incremento (1.6 veces) fue inferior al que previamente habíamos descrito (6.6 veces) para las mismas células crecidas en MM conteniendo agar Pronadisa (0.6%) (Soto *et al.*, 2002).
2. La delección del gen *smc00525* no provoca variaciones notables en el número de flagelos de GR4 ni GR4fadD (Tabla 1).

	GR4	GR4 $\Delta$ 525	GR4fadD	GR4fadD $\Delta$ 525
Media n° flagelos por célula	3,19607843	3,35555556	5,05714286	5,65
Error típico	0,1559779	0,15940405	0,21279594	0,25417565
N	51	45	35	20

**Tabla 1.** Valor medio del número de flagelos por célula en distintos mutantes derivados de GR4, indicando el error estándar de la media así como el número de células analizadas (N).

3. Los mutantes *flaAB* tanto de GR4 como de GR4fadD, carecen de filamentos flagelares normales asociados a la célula (figura 24). Sí se observaron alrededor de las células estructuras filamentosas muy rectas y cortas que podrían ser el resultado de la fragmentación de flagelos aberrantes deficientes en la flagelina mayoritaria FlaA (Scharf and Schmitt, 2002).
4. Los mutantes *flgk* carecen de flagelos y cualquier otra estructura filamentosa
5. Todas las cepas estudiadas presentaron un tamaño celular similar de aproximadamente 2  $\mu\text{m}$ , viéndose éste incrementado en el caso del triple mutante GR4fadD $\Delta$ 525*flaAB* con una longitud celular media de 3.37  $\mu\text{m}$ .

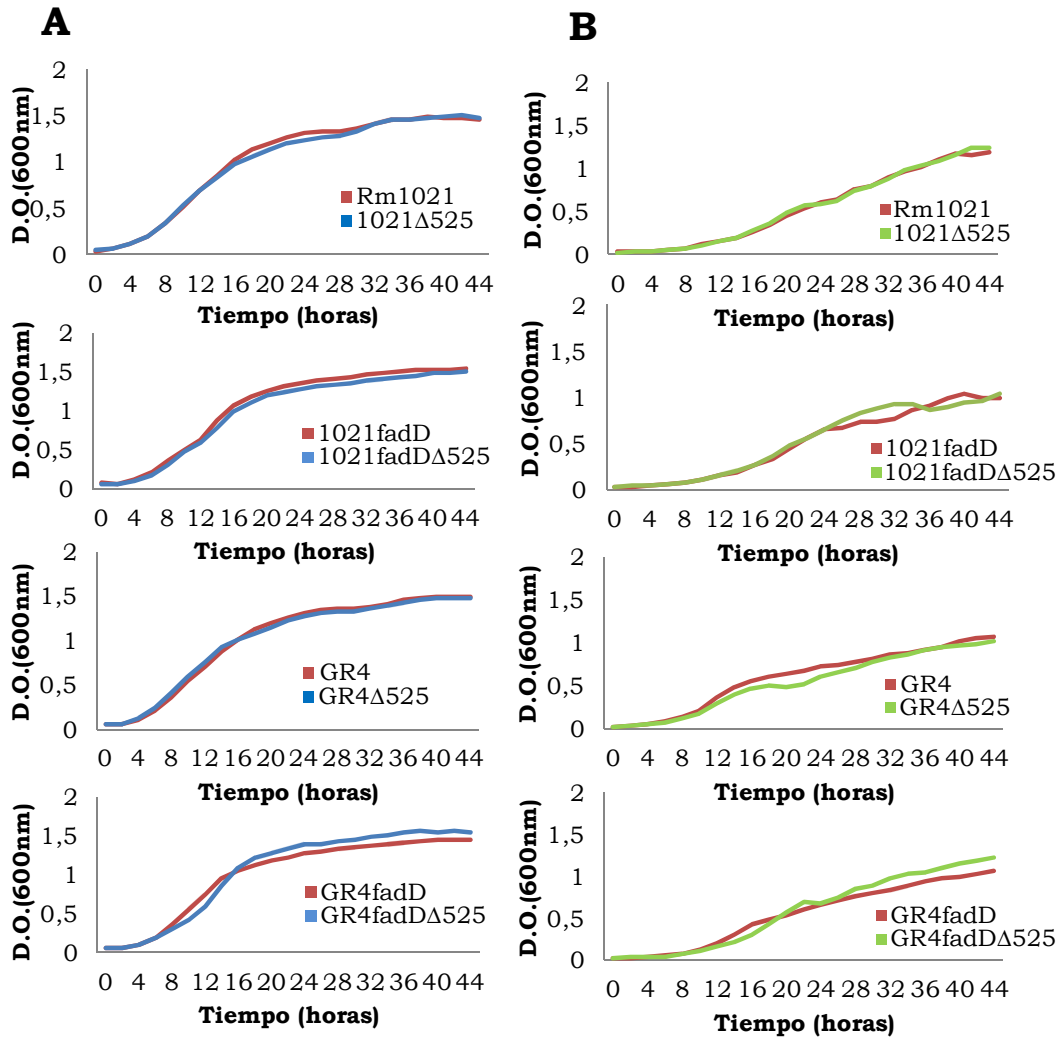
#### 2.1.3.3 Crecimiento

Curvas de crecimiento realizadas tanto en medio rico TY como en MM, revelan que la delección del gen *smc00525* no causa alteraciones en el crecimiento de ninguna de las cepas ensayadas (figura 25).

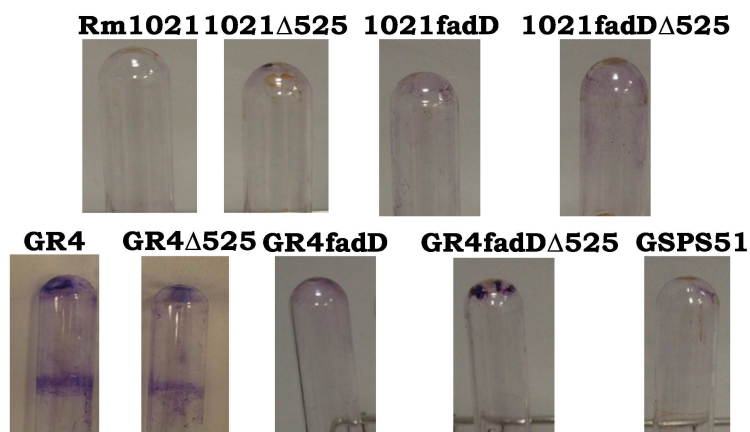
#### 2.1.3.4 Formación de biopelículas

Se ensayó la capacidad de formación de biopelículas de los distintos mutantes y sus cepas parentales en tubo de vidrio a las 24, 72 y 120 horas. Como se puede apreciar en la figura 26, no se detectaron diferencias significativas entre las cepas delecionadas y sus correspondientes cepas parentales.



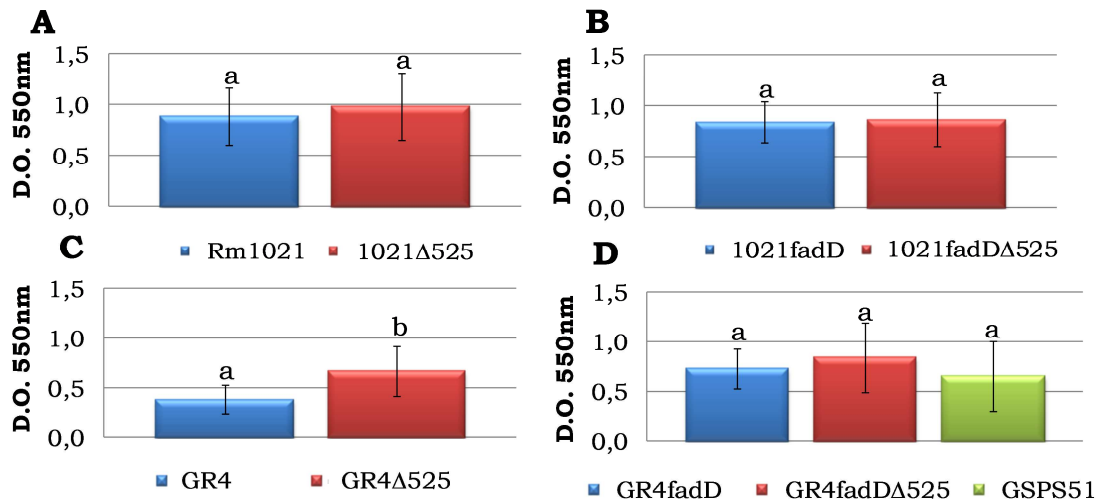


**Figura 25.** Curvas de crecimiento en medio TY (A) y en MM (B) de los mutantes delecionados en el gen *smc00525* y sus correspondientes cepas parentales.



**Figura 26.** Formación de biopelícula en tubos de vidrio de distintas cepas de *S. meliloti* tras cinco días de incubación estática. Se incluye el transposante GSPS51: (GR4FDCSS*smc00525*::Tn5).

Por el contrario, sí que se observó alguna diferencia cuando se ensayó la capacidad de formación de biopelículas en placas multipocillo de PVC. Los resultados obtenidos tras incubación de los cultivos en MM durante 48h se muestran en la figura 27.



**Figura 27.** Efecto del gen *smc00525* en la capacidad de formar biopelículas en placas de PVC en las cepas de *S. meliloti* Rm1021 (A), 1021fadD (B), GR4 (C) y GR4fadD (D). En el gráfico D se muestra también la cantidad de biopelícula formada por el transposante GSPS51 (GR4FDCSS (*smc00525*::Tn5)). Las barras representan la desviación estándar de la media de un total de 20 medidas realizadas por cepa en cuatro experimentos independientes. Índices distintos señalan diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

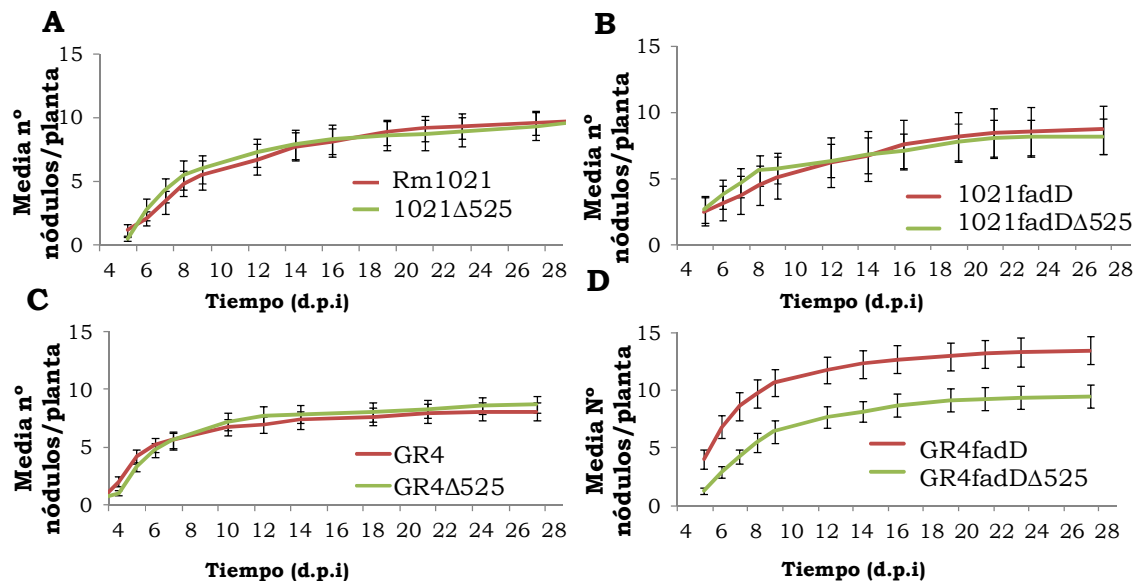
Sólo el mutante derivado de GR4 delecionado en el gen *smc00525*, mostró mayor formación de biopelícula que su correspondiente cepa parental (figura 27C).

#### 2.1.3.5 Fenotipo simbiótico

Los ensayos de nodulación realizados en plantas de alfalfa han demostrado que todos los mutantes delecionados en el gen *smc00525* son capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno. Además, se observó que la capacidad infectiva de los mutantes 1021Δ525, 1021fadDA525 y GR4Δ525 era similar a la mostrada por las correspondientes cepas parentales (figura 28A, B y C). Interesantemente, siguiendo la misma tendencia observada en el transposante GSPS51 (capítulo 1), el mutante GR4fadDA525 es significativamente menos infectivo que la cepa parental (figura 28D), confirmando que el fenotipo simbiótico mostrado por GSPS51 es consecuencia de la alteración generada por el Tn5 en el gen *smc00525*. Experimentos de competitividad por la nodulación revelan que la pérdida de función de *smc00525* no altera la capacidad competitiva de Rm1021 ni 1021fadD (fig. 29A). Aunque GSPS51 no mostró diferencias en capacidad competitiva (capítulo 1), hemos comprobado

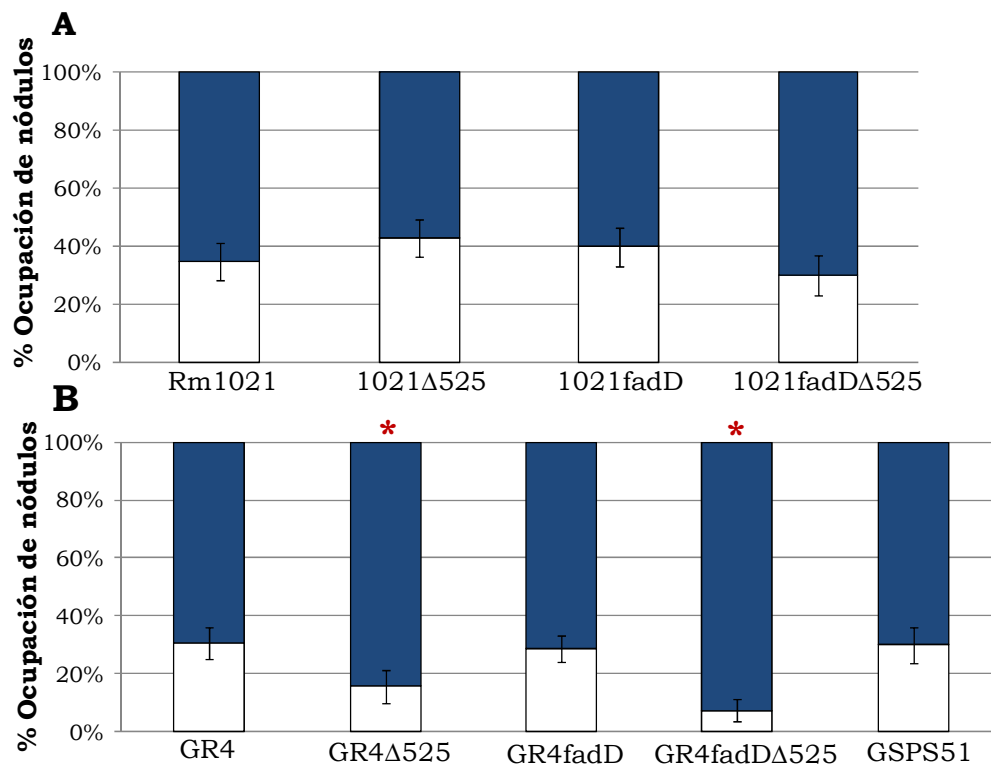


que los mutantes delecionados GR4 $\Delta$ 525 y GR4fadD $\Delta$ 525 son mucho menos competitivos por la nodulación de alfalfa, ocupando un 60 y 75% menos nódulos respectivamente, que las correspondientes cepas parentales (figura 28B). El mayor defecto simbiótico mostrado por la cepa delecionada GR4fadD $\Delta$ 525 en comparación con el transposante GSPS51, quizás sea indicativo de cierta funcionalidad de los primeros 870 aas de la proteína que se encuentran presentes en el transposante pero no en la cepa delecionada.



**Figura 28.** Eficiencia de nodulación en *M. sativa* de los mutantes delecionados en el gen *smc00525* y sus correspondientes cepas parentales. Cada punto es la media de 24 réplicas. Las barras representan el error estándar con un intervalo de confianza del 95%.

Así, el gen *smc00525*, que codifica una hipotética proteína transmembrana, además de participar en el control de la movilidad en superficie de la cepa GR4 de *S. meliloti*, contribuye positivamente a la eficiencia infectiva y a su capacidad competitiva por la nodulación de alfalfa, efectos que no son observables en el fondo genético de la cepa Rm1021.

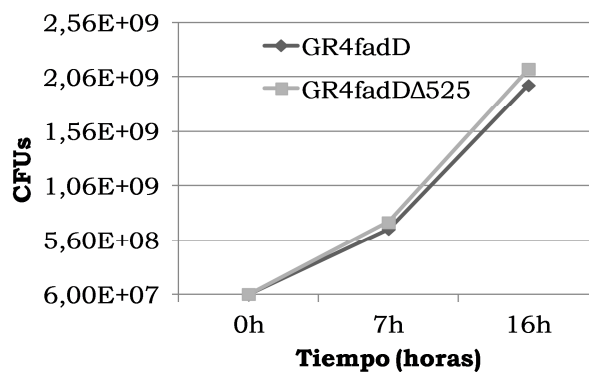


**Figura 29.** (A) Porcentaje medio de ocupación de nódulos de los mutantes afectados en el gen *smc00525* derivados de Rm1021 y en (B) de GR4 tras inocular con la cepa 1021(pGUS3) o GR4(pGUS3) portadoras del plásmido (pGUS3) en una proporción 1:1. Tras la incubación con X-Gluc, los nódulos ocupados por la cepa parental portadora del plásmido se tiñen de azul, su porcentaje de ocupación es representado también con dicho color. Los datos muestran la media y el error estándar de 24 plantas en dos experimentos independientes con un nivel de confianza del 95%. (\*) Indica los mutantes cuya capacidad competitiva es significativamente distinta a la de referencia, según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

#### 2.1.3.6 Análisis transcriptómico del mutante GR4fadD $\Delta$ 525 crecido en una superficie semisólida.

Con el fin de dilucidar el papel del gen *smc00525* se compararon los transcriptomas de *S. meliloti* GR4fadD y GR4fadD $\Delta$ 525 tras crecimiento en una superficie semisólida (MM 0.6% AN) durante 7 horas. Se seleccionó este doble mutante por presentar el mayor defecto simbiótico (menos infectivo y menos competitivo por la nodulación que la cepa parental).

Previo a dicho estudio realizamos curvas de crecimiento en MM semisólido de ambas cepas, comprobando que ambas tenían un comportamiento crecimiento similar (figura 30).



**Figura 30.** A) Representación gráfica del crecimiento en MM 0.6% agar noble de GR4fadD y GR4fadDΔ525. CFUs, unidades formadoras de colonia por placa.

Utilizando los criterios de selección  $p < 0.05$ ,  $A > 7$  y  $M \geq 1$  o  $M \leq 1$ , el análisis transcriptómico reveló que la delección de *smc00525* en GR4fadD altera la expresión de un total de 493 genes. De todos ellos, 257 mostraban mayor expresión en el doble mutante GR4fadDΔ525, mientras que 236 se encontraban reprimidos en comparación con lo mostrado por GR4fadD.

Más del 30% de los genes diferencialmente expresados formaban parte de supuestos operones en los que dos o más genes aparecían con una expresión diferencial en nuestras condiciones experimentales.

En la tabla 2 se indica el número de genes diferencialmente expresados distribuidos en las distintas categorías funcionales, así como la distribución de estos en los distintos replicones de *S. meliloti* Rm1021 y el porcentaje que representan con respecto al total. Teniendo en cuenta el porcentaje de genes de Rm1021 distribuidos en cada uno de los replicones (cromosoma 53.85%; pSymA 20.84%; pSymB 25.3%) el análisis transcriptómico revela que la delección de *smc00525* no afecta por igual a los distintos replicones alterándose fundamentalmente genes del pSymA (tabla2).

	<b>Cromosoma</b>	<b>pSymA</b>	<b>pSymB</b>	<b>TOTAL</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Hipotéticas proteínas</b>	73 33 40	61 20 41	47 19 28	181 72 109	36.71%
<b>Genes implicados en procesos celulares</b>	52 32 20	21 13 8	27 15 12	100 60 40	20.3%
<b>Elementos de origen externo</b>	17 2 15	13 4 9	7 6 1	37 12 25	7.5%
<b>Reguladores transcripcionales</b>	12 9 3	13 5 8	9 6 3	34 20 14	6.9%
<b>Elementos estructurales</b>	6 1 5	1	10 7 3	17 9 8	3.45%
<b>Genes implicados en el metabolismo de pequeñas moléculas</b>	31 15 16	23 11 12	27 21 6	81 47 34	16.43%
<b>Genes implicados en el metabolismo intermediario</b>	4	5 1 4	11 6 5	20 7 13	4.05%
<b>Genes implicados en el metabolismo de macromoléculas</b>	15 4 11	3 1 2	1	19 6 13	3.85%
<b>Genes implicados en nodulación</b>	0	2 1 1	2	4 3 1	0.81%
<b>TOTAL DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS</b>	210 (42.6%) 96 114	142 (28.8%) 57 85	141 (28.6%) 83 58	493 236 257	100%

**Tabla 2.** Categorías funcionales en que se distribuyen los genes diferencialmente expresados en cada uno de los replicones. En verde se muestran aquellos genes cuya expresión se encuentra disminuida en GR4fadD $\Delta$ 525 con respecto a GR4fadD. En rojo se indican el número de genes de cada categoría que aparecen inducidos en el doble mutante con respecto al simple. Se incluye el número total de genes pertenecientes a las distintas categorías funcionales y el porcentaje que representan con respecto al cómputo global de genes diferencialmente expresados.

La categoría funcional más representada en el transcriptoma fue la de hipotéticas proteínas de función desconocida (36.7%) que desafortunadamente no proporciona información sobre la posible función de *smc00525*. A pesar de que el mutante muestra hipermovilidad en superficie, el transcriptoma no ha revelado la expresión diferencial de genes flagelares o de motilidad lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio utilizando derivados aflagelados que indican que la pérdida de función de *smc00525* en GR4fadD promueve movimiento independiente de flagelos (fig. 23). Los dos genes que presentaron mayor inducción en el mutante fueron dos genes relacionados con el metabolismo de la prolina: *smc03253* que codifica una prolina hidroxilasa y *proB2* que codifica una glutamato-5-kinasa. Entre lo más

destacable llama la atención, por un lado, la inducción en el mutante GR4fadDΔ525 de hasta 25 elementos de origen externo, fundamentalmente transposasas pertenecientes a distintas secuencias de inserción (IS), e integrasas. Por otro, la menor expresión en el mutante de un alto porcentaje de genes relacionados con el metabolismo y la captación de hierro, entre ellos: los genes relacionados con la síntesis y captación del sideróforo rizobactina 1021 (Rhb101): *rhbA*, *rhbB*, *rhbC*, *rhbD*, *rhbE*, *rhbF*, *rhtA* y *rhtX* (Lynch *et al.*, 2001), los genes *exbB* y *exbD* que codifican los componentes de membrana interna que forman parte del complejo energizante dependiente de TonB requerido por sistemas de captación de sideróforos acoplejados a Fe<sup>3+</sup> (Wandersman and Delepelaire, 2004), genes para la captación de compuestos asociados a grupo hemo (*hmuP*, *hmuS*, *hmuT*, *hmuU*, *shmR*), el gen *fhuP* que codifica la permeasa que participa en captación de sideróforos tipo hidroxamato como ferricromo y ferrioxamina B o el gen *fhuF* que codifica una sideróforo reductasa (Cuiv *et al.*, 2008; Wexler *et al.*, 2001). Curiosamente, prácticamente todos estos genes se habían identificado como genes cuya expresión se inducía en el mutante 1021fadD en respuesta a crecimiento en condiciones inductoras de movilidad en superficie (Nogales *et al.*, 2010).

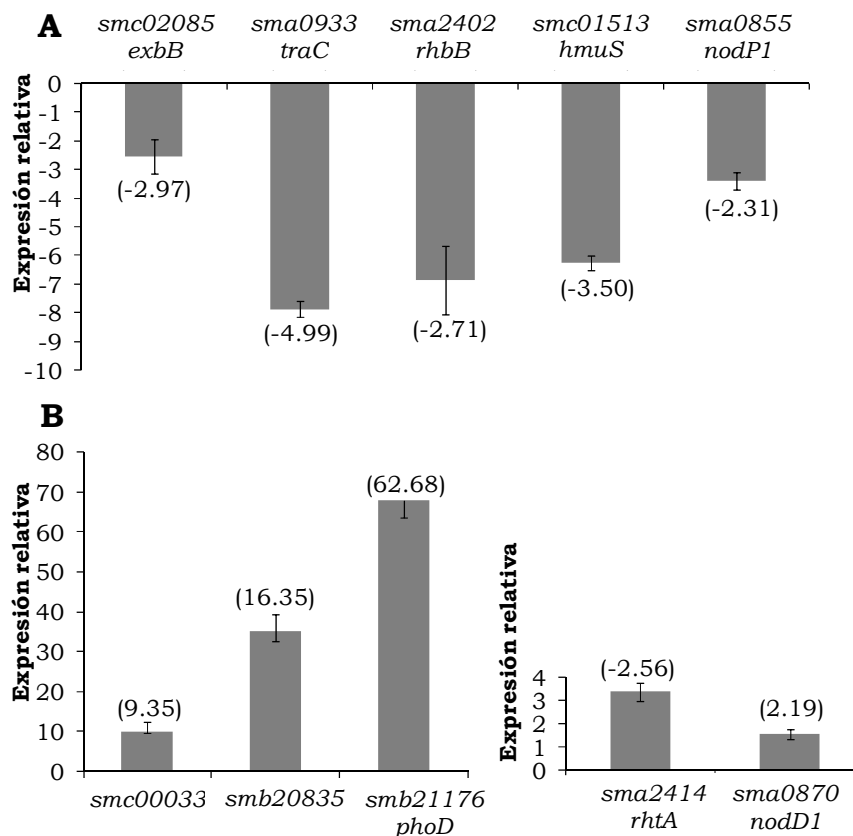
Otra dato llamativo fue el encontrar en el doble mutante una expresión diferencial de genes relacionados con la nodulación a pesar de que el transcriptoma se ha llevado a cabo en ausencia inductores de genes *nod*. Entre ellos se encuentran los genes *nodP2-nodQ2* (*smb21223-smb21224*) y *nodP1* (*sma0855*) que presentan una menor expresión en GR4fadD525, mientras que el activador transcripcional *nodD1* (*sma0870*) aparece más expresado en éste. Además, se detectó una mayor inducción de los sistemas de transporte de nitrato (*nrtC*, *nrtB* y *nrtA*), de sulfonatos (*smc02344* y *smc02345*), de fósforo (*pstS*, *smc02145*, *smc02144*, *pstA*, *pstB*, *phoU*) incluido el regulador de respuesta *phoB*, así como sistemas de transporte tipo ABC como los relacionados con el transporte de la espermidina-putrescina (*sma0237*, *smb20281* y *smb20282*). Entre los sistemas de transporte que aparecen menos expresados en el mutante *smc00525* podemos destacar transportadores multidroga (*smc02867*, *smc02868*), de ácido pirúvico (*smb21352*, *smc02773* o *smc02774*), polyol (*smc01624*, *smc01627*, *smc01628*), alfa-glucósidos *aglE*, *aglG*, *aglK* (*smc03061*, *smc03063*, *smc03065*), monosacáridos (*smb20442*, *smb20443*) o sulfatos (*smb21132*, *smb21133*). Varios son los reguladores transcripcionales que aparecen diferencialmente

expresados como *exsI* (*smb20935*) o los factores sigma *rpoE1* (*smc01419*) y *rpoE4* (*smc04051*), que aparecen más inducidos en el mutante, presentando altos niveles de inducción en el caso de estos dos últimos; mientras que el regulador transcripcional *tacA*, dependiente de  $\sigma^{54}$ , presenta ciertos niveles de represión en GR4fadD $\Delta$ 525. Finalmente, aparece una menor expresión de los genes *fixOPQ3* (*sma0615-sma0616-sma0617*), así como de la sintasa de AHLs, *sinI* (*smc00168*) en el mutante *smc00525*.

La validez del análisis transcriptómico se obtuvo confirmando la expresión diferencial de algunos de los genes identificados en este análisis mediante una tecnología independiente (reverso transcripción del ARN y PCR a tiempo real). Para ello, se seleccionaron algunos de los genes que se encontraron reprimidos en el doble mutante. Como representantes de genes reprimidos en GR4fadD525 se escogieron varios genes implicados en la captación y metabolismo del hierro, como *exbB* (*smc02085*), *hmuS* (*smc01513*) o los genes *rhbB* y *rhtA* responsables de la síntesis y transporte del sideróforo Rhb1021. Dentro del grupo de genes reprimidos también se analizó el gen *sma0933* que codifica una proteína implicada en conjugación (*traC*) ya que disponíamos de oligos para este gen. Por otro lado, como representantes de genes más expresados en el doble mutante se escogieron los genes *phoD* (*smb21176*) perteneciente al operón *phoTEDC* que codifica un sistema de captación de fósforo necesario para la fijación de N en simbiosis (Bardin *et al.*, 1996); *smc00033* que codifica una proteína con dominio EAL característico de fosfodiesterasas (Wang *et al.*, 2010), la única de este tipo diferencialmente expresada en estas condiciones experimentales y que podría estar implicada en la degradación del c-di-GMP; y una hipotética proteína (*smb20835*) como representante de esta categoría funcional.

Finalmente se seleccionaron los genes implicados en nodulación *nodP1* y *nodD1* (más y menos en el mutante *smc00525*, respectivamente), por lo inesperado de su expresión diferencial en las condiciones en las que se llevó a cabo el transcriptoma.

Los resultados obtenidos en las RT-qPCR se muestran en la figura 31.



**Figura 31.** Confirmación de la expresión diferencial mediante RT-PCR cuantitativa de los genes identificados en el análisis transcriptómico de un doble mutante *fadDsmc00525* de *S. meliloti* en respuesta a una superficie semisólida. Valores de expresión relativa obtenidos de algunos genes (A) menos expresados en GR4fadD $\Delta$ 525 y (B) los más expresados en éste. Para facilitar las comparaciones, se indica el valor de la expresión génica obtenida en los *microarray* (calculado como  $2^M$ ) entre paréntesis. Los resultados corresponden a las medias de al menos dos experimentos biológicos independientes con tres repeticiones técnicas. Las barras indican el error estándar con un nivel de confianza del 95%.

Los resultados de la PCR a tiempo real confirmaron los resultados del *microarray* en todos los genes estudiados salvo para los casos de *nodD1* que apareció con niveles muy similares de expresión en las dos cepas, y de *sma2414* (*rhtA*) que apareció ligeramente inducido en el doble mutante *fadDsmc00525*.

#### 2.1.3.7 Influencia de la delección *smc00525* en expresión de genes *nod*.

La aparición de hasta cuatro genes *nod* entre los genes diferencialmente expresados en GR4fadD, nos llevó a investigar la expresión del gen *nodC* de *S. meliloti* en cepas delecionadas en *smc00525*, usando la fusión transcripcional pRmM57 (*nodC::lacZ*). Como control de expresión constitutiva se utilizó el

plásmido pGD499 (*npt::lacZ*). La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó en células de GR4, GR4 $\Delta$ 525, GR4fadD y GR4fadD $\Delta$ 525 conteniendo pRmM57 ó pGD499 tras crecimiento en MM líquido en ausencia o presencia de luteolina 5  $\mu$ M. Además, en el caso de las cepas GR4fadD y GR4fadD $\Delta$ 525 también se analizó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de células crecidas en medio mínimo semisólido en ausencia o presencia del inductor luteolina.

Los resultados obtenidos revelaron valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa 5 veces superiores de la fusión transcripcional *nodC-lacZ* en respuesta a luteolina en los derivados *smc00525* de GR4 y GR4fadD en medio líquido (tabla 3) y de 9 veces superior en GR4fadD $\Delta$ 525 en condiciones inductoras de movilidad en superficie (tabla 4).

Plásmido	Actividad $\beta$ -Galactosidasa (Unidades Miller)			
	pRmM57		pGD499	
	-	+	-	+
GR4	28.7	266,24	309.95	346.84
GR4 $\Delta$ 525	17.9	1346,93	368	455
GR4fadD	7.25	191	304	416.8
GR4fadD $\Delta$ 525	21.42	1119.5	330,67	333,22

**Tabla 3.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa en distintas cepas de *S. meliloti* conteniendo las fusiones transcripcionales *nodC::lacZ* y *npt::lacZ* tras crecimiento en MM líquido. (-) ausencia de luteolina, (+) presencia de luteolina 5  $\mu$ M.

Plásmido	Actividad $\beta$ -Galactosidasa (Unidades Miller)			
	pRmM57		pGD499	
	-	+	-	+
GR4fadD	10.7	236.75	205	548.65
GR4fadD $\Delta$ 525	26.5	2261.63	330	333,22

**Tabla 4.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa en distintas cepas de *S. meliloti* conteniendo las fusiones transcripcionales *nodC::lacZ* y *npt::lacZ* tras crecimiento en MM semisólido. (-) ausencia de luteolina, (+) presencia de luteolina 5  $\mu$ M.



# **CAPÍTULO II.**

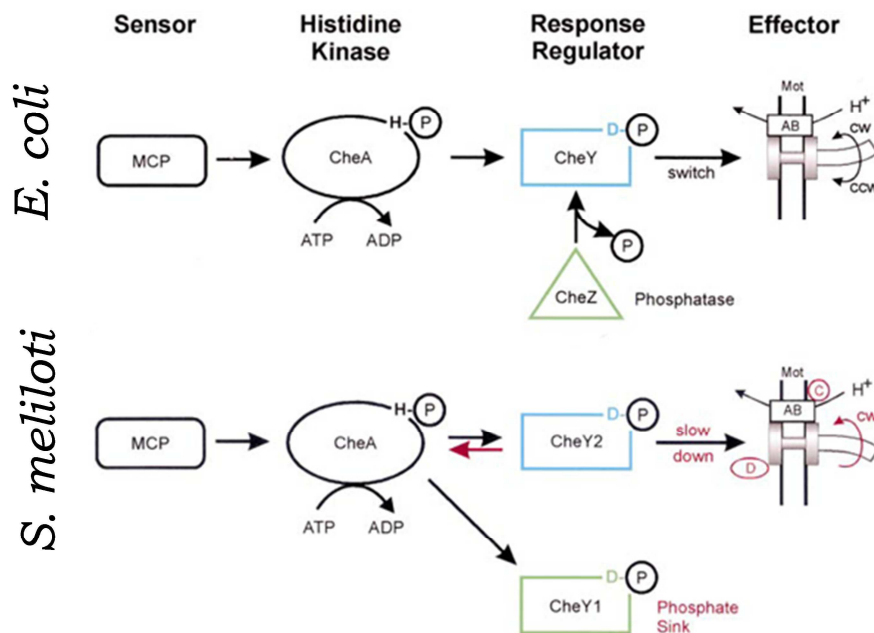
## **DISCUSIÓN**



El aislamiento y caracterización de transposantes de *S. meliloti* alterados en movilidad en superficie llevado a cabo en el primer capítulo de esta Tesis, permitió desvelar una serie de genes potencialmente responsables del mayor desplazamiento en superficie característico de mutantes *fadD* de nuestra bacteria de estudio. La mayoría de los genes identificados participan en el control de movilidad general, grupo en el que se engloban diversos genes con funciones en la síntesis, ensamblaje y funcionamiento del flagelo, evidenciando así la importancia del *swarming* en el desplazamiento en superficie de estas bacterias. Los genes *cheA* (quimiotaxis), *sodA/B* (estrés oxidativo) y *emma* (junto con *emmBC*, regulador de movilidad y EPS) también se identificaron dentro del grupo de genes que afectan de forma general la movilidad bacteriana. Interesantemente, la aproximación genética permitió desvelar dos genes con función específica en la translocación en superficie de mutantes *fadD* de *S. meliloti*: el gen *exoX* previamente relacionado en la literatura con regulación a nivel post-traducciona l de los niveles de EPS I (Reed *et al.*, 1991), y el gen *smc00525* que codifica una proteína de gran tamaño de función hasta ahora desconocida. En ambos casos, la inserción del Tn5 daba lugar a una hipermovilidad en superficie en los mutantes *fadD*, sin afectar la movilidad tipo *swimming*. Además, el transposante afectado en *smc00525* mostraba un defecto simbiótico, siendo menos infectivo que la cepa parental. Con objeto de corroborar la participación de estos genes en la movilidad en superficie de *S. meliloti*, y en su caso profundizar sobre su mecanismo de acción, en este capítulo se han obtenido mutantes por delección de los genes *exoX* y *smc00525*, en cuatro fondos genéticos de *S. meliloti*: GR4, Rm1021 y los correspondientes derivados *fadD* GR4*fadD* y 1021*fadD*. Al igual que en el capítulo anterior, el motivo de utilizar las cepas GR4 y Rm1021 en esta caracterización se ha basado en el hecho constatado de la existencia en ellas de mecanismos distintos de control de la movilidad en superficie. Adicionalmente, se decidió abordar la obtención de mutantes delecionados en el gen de quimiotaxis *cheA* ya que aunque el transposante afectado en este gen mostraba menor movilidad tipo *swimming* que la cepa parental, sin embargo, en superficie presentaba hipermovilidad, fenotipo opuesto al descrito en la literatura para bacterias como *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *E. coli* o *Salmonella* donde mutantes en el sistema de quimiotaxis son defectivos en movilidad *swarming* (revisado en Partridge and Harshey, 2013a). Como resultado de estos estudios hemos podido concluir que el gen *cheA* no es esencial en el

desplazamiento en superficie de *S. meliloti*, a diferencia de los genes *exoX* y *smc00525* que sí participan en este tipo de movilidad, si bien los efectos observados son dependientes del fondo genético de la bacteria.

El gen *cheA* de *S. meliloti* codifica la histidín quinasa del sistema de quimiotaxis responsable de controlar el motor flagelar en respuesta a señales detectadas por quimiorreceptores (MCP). En *S. meliloti*, la disminución de atrayente o incremento de repelente induce la autofosforilación de CheA que rápidamente transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta CheY2 que en su forma fosforilada interacciona con el motor flagelar provocando una desaceleración en la velocidad de rotación del flagelo (figura 32).



**Figura 32.** Esquema comparativo de los sistemas de quimiotaxis y su acción sobre el motor flagelar en *E. coli* y *S. meliloti*. Los componentes generales de esta vía corresponden a proteínas de quimiotaxis asociadas a membranaceptoras de metilos (MCP), proteínas de quimiotaxis (Che) y las proteínas del motor (Mot). Histidyl (H), aspartyl (D) fosforilación (P), flujo de protones ( $H^+$ ) a través de los canales MotA–MotB. Sentido de rotación flagelar en el mismo sentido de las agujas del reloj (cw) o en sentido contrario (ccw). Colores idénticos muestran proteínas análogas con función distinta. El color rojo indica las diferencias entre ambos modelos, incluyendo las proteínas MotC y MotD (Schmitt, 2002).

Los cuatro mutantes deletados en el gen que codifica para la autoquinasa CheA mostraron el comportamiento descrito en la literatura para un mutante *cheA* derivado de la cepa RU11 de *S. meliloti* (Sourjik and Schmitt, 1996) caracterizado por la reducción significativa en el halo de movilidad *swimming* en comparación con el mostrado por sus correspondientes cepas parentales. Sin embargo, en superficie de medio semisólido los distintos mutantes

delecionados presentaron una capacidad de translocación muy similar a la de las cepas parentales (figura 3). En estos ensayos de movilidad en superficie, el transposante SPS324 (1021FDCSS*cheA*::Tn5) tuvo el mismo comportamiento que la cepa parental 1021fadD, no detectándose la hipermovilidad que motivó su aislamiento en el capítulo 1. Desconocemos a qué puede ser debido este distinto comportamiento. Es de destacar, no obstante, el hecho de que las cepas Rm1021 y 1021fadD presentaran en estos nuevos ensayos mayor capacidad de translocación que en los realizados durante la selección de los transposantes. Una posible explicación al distinto comportamiento observado para el transposante SPS324 es que la hipermovilidad asociada a una mutación *cheA* sólo se ponga de manifiesto en condiciones más restrictivas para la translocación en superficie, hipótesis que no se ha investigado en este trabajo. En cualquier caso, el hecho de que los mutantes delecionados en *cheA* no mostraran un comportamiento en superficie distinto al de sus correspondientes cepas parentales, fenotipo deseable para alcanzar los objetivos inicialmente marcados en este trabajo de Tesis doctoral, nos llevó a desistir en continuar con la caracterización de estos mutantes.

A pesar de esto y de que el transposante SPS324 tuviera un comportamiento variable (mayor o igual movilidad en superficie que la cepa parental), lo que sí podemos concluir de los resultados obtenidos en este estudio es que, a diferencia de enterobacterias, el gen *cheA* del sistema de quimiotaxis no es esencial en el movimiento en superficie de *S. meliloti*. Sólo podemos especular sobre las razones del distinto requerimiento del sistema de quimiotaxis en estas bacterias. Una posibilidad es que la diferencia estribe en el distinto modo de rotación de los flagelos. En enterobacterias, la respuesta quimiotáctica se consigue cambiando el sentido de rotación de los flagelos (Macnab, 1996) (figura 32). Los flagelos de *S. meliloti*, por el contrario, sólo pueden rotar en el sentido de las agujas del reloj, y las células responden a estímulos quimiotácticos mediante desaceleraciones y paradas asíncronas de filamentos flagelares individuales (Attmannspacher *et al.*, 2005). En bacterias como *Salmonella*, la capacidad de revertir el sentido de rotación de los flagelos es esencial en *swarming* (Mariconda *et al.*, 2006). Se piensa que esto es debido a que el cambio en el sentido de rotación podría ayudar a despegar los flagelos que pudieran quedar atrapados en un medio viscoso y a generar la suficiente humedad como para desplazarse en superficie. En *S. meliloti*, los flagelos de los mutantes *cheA* se caracterizan por presentar máxima velocidad de rotación

(Sourjik and Schmitt 1996), lo que podría evitar que quedasen atrapados en medios viscosos y al mismo tiempo facilitar la humectación de la superficie. Otra posibilidad no excluyente es que en *S. meliloti* existan determinadas señales o moléculas que sean capaces de fosforilar al regulador de respuesta CheY2, de una forma totalmente independiente de CheA, y que actúen únicamente en condiciones inductoras de translocación en superficie y no durante el *swimming*. En *Salmonella*, CheY puede ser fosforilado por moléculas de bajo peso molecular que actúan como donadores de fósforo, como acetil fosfato, carbamil fosfato y fosforamidato (Da Re *et al.*, 1999).

El gen *exoX* se identificó como el gen alterado en un transposante derivado de 1021fadD que mostró hipermovilidad en superficie. En *S. meliloti*, *exoX* codifica un regulador que afecta negativamente a la cantidad de succinoglucano o EPS I producido por la bacteria mediante un mecanismo post-traduccional en el que la estequiometría con ExoY, enzima que participa en las primeras etapas de la síntesis del polisacárido, parece ser importante (Reed *et al.*, 1991). El sistema ExoX-Y de regulación de los niveles de EPS se ha descrito en otros dos rizobios y en el caso de *R. leguminosarum* bv. phaseoli se ha propuesto que dicha regulación es importante en la simbiosis (Borthakur and Johnston, 1987; Gray *et al.*, 1990). En *S. meliloti*, mutaciones en *exoX* causan un incremento en la producción de EPS I (mayoritariamente la fracción de bajo peso molecular), mientras que la presencia de *exoX* en multicopia reduce significativamente los niveles de succinoglucano. En este trabajo demostramos que una delección en el gen *exoX*, además de incrementar la producción de EPS I tal y como se describe en la literatura, incrementa la capacidad de la bacteria de formar biopelículas sobre superficies abióticas, efecto que es independiente del fondo genético de *S. meliloti* del que se trate (Rm1021, GR4 o mutantes *fadD* derivados). La mayor capacidad de formar biopelículas asociada a los mutantes delecionados en *exoX* se debe exclusivamente a la superproducción de EPS I, ya que una mutación en *exoY* que abole la síntesis del polisacárido, revierte el fenotipo a la situación de la cepa parental.

Los ensayos de movilidad realizados con las distintas cepas delecionadas en *exoX* han permitido comprobar que la pérdida de función de este gen no sólo induce movilidad en superficie en la cepa 1021fadD, sino también en la cepa Rm1021, pero por el contrario, apenas existen efectos apreciables en las cepas

derivadas de GR4 (figura 6). La mayor translocación en superficie mostrada por el mutante *exoX* de Rm1021 se debe a la estimulación tanto de movilidad tipo *swarming* como de un movimiento independiente de flagelos existente en esta cepa de *S. meliloti* (Nogales *et al.*, 2012), como así se deduce del comportamiento exhibido por derivados aflagelados. Por otro lado, el empleo de mutantes *exoY* nos ha permitido demostrar que aunque la producción de niveles normales de EPS I no es esencial en la translocación en superficie de Rm1021, la superproducción de este polisacárido es responsable de la hipermovilidad mostrada por mutantes *exoX* de Rm1021 y *1021fadD*. El incremento en los niveles de este polisacárido podría facilitar la translocación en superficie funcionando como un surfactante que disminuye la fricción entre células y con la superficie del medio, o incluso actuando como osmolito que consigue extraer del agar subyacente, el agua que consigue dotar a las células del nivel de humedad suficiente para el correcto funcionamiento de los flagelos (Partridge and Harshey, 2013b). Son varios los casos descritos en los que se ha relacionado a polisacáridos y surfactantes con la función de promover la movilidad de diversas bacterias (Daniels *et al.*, 2004; Verstraeten *et al.*, 2008). Quizás el ejemplo más cercano sea el del polisacárido ácido Cmf (Colony Migration Factor) producido por *P. mirabilis* (Gygi *et al.*, 1995b).

Como se ha comentado, el notable incremento en capacidad de translocar en superficie causado por la delección *exoX* en las cepas derivadas de Rm1021 (incrementos superiores al 66%) contrasta con la ausencia o efecto mínimo causado en las derivadas de GR4. Desconocemos la razón por la cual los mutantes *exoX* derivados de las cepas GR4 y GR4fadD, que también producen mayor cantidad de EPS I, no muestran mayor translocación en superficie. Una posibilidad es que el control de la síntesis de EPS I (en cantidad, calidad, grado de polimerización...etc.) sea distinto entre las cepas GR4 y Rm1021, y que esas diferencias sean importantes en la función que el EPS I pueda tener en movilidad. Otra posibilidad no excluyente sería son que la mayor producción de EPS I incremente el efecto de otros componentes con función en translocación superficial que se encuentren presentes en Rm1021 pero no en GR4, como es el caso del sideróforo Rhb1021 (Nogales *et al.*, 2010).

Aunque la delección del gen *exoX* afecta la producción de un polisacárido simbióticamente importante y existen datos en la literatura que asocian defectos en la simbiosis bien con la mutación *exoX* (Borthakur and Johnston, 1987), bien con mutaciones en genes reguladores como *cbrA*, o *ntrX* que

también causan superproducción de EPS I además de otros efectos, (Gibson *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2013), en este estudio no se han detectado alteraciones en las propiedades simbióticas de los mutantes *exoX* de *S. meliloti*. No es descartable, no obstante, que en condiciones ambientales menos ideales que las empleadas en nuestros experimentos (menor cantidad de inóculo, competencia con otros microorganismos rizosféricos, estreses ambientales, etc), los niveles incrementados de EPS I y la mayor capacidad de formar biopelículas generados por una mutación *exoX*, puedan repercutir en la capacidad de interaccionar eficientemente con su planta hospedadora.

El gen *smc00525* se identificó como el gen alterado en un transposante derivado de GR4fadD que mostró hipermovilidad en superficie y menor capacidad infectiva en plantas de alfalfa que la cepa parental. En *S. meliloti*, *smc00525* teóricamente codifica una proteína transmembrana de función desconocida con homólogos en otros rizobios. La proteína muestra en el extremo N-terminal un sitio de unión a ATP típico de proteínas quinasas que sugiere que podría funcionar en un proceso de señalización modulando la actividad de otras proteínas mediante fosforilación, supuesto que no ha sido investigado en este trabajo.

Los ensayos de movilidad realizados con las distintas cepas delecionadas en *smc00525* obtenidas en este estudio han permitido comprobar que este gen no participa en movilidad tipo *swimming* pero sí afecta al desplazamiento en superficie, aunque con distintos resultados dependiendo de la cepa de *S. meliloti* de la que se trate. Así, mientras en GR4fadD la deleción del gen causa hipermovilidad, en Rm1021 y 1021fadD reduce (33 y 21%, respectivamente) la capacidad de la bacteria de desplazarse en superficie. Este distinto efecto en movilidad en superficie causado por la misma mutación, vuelve a poner de manifiesto la existencia de mecanismos de control diferentes para este fenotipo en las cepas GR4 y Rm1021 de *S. meliloti*. La identificación de nuevas condiciones experimentales más permisivas y reproducibles para el ensayo de movilidad en superficie (ver capítulo 3), nos ha permitido analizar el efecto de la deleción de *smc00525* en GR4, una cepa que hasta entonces no había mostrado capacidad de desplazarse en superficie. Se ha comprobado que la deleción *smc00525* reduce la movilidad *swarming* mostrada por GR4, así como un desplazamiento independiente de flagelos que se pone de manifiesto en una cepa derivada incapaz de ensamblar el gancho flagelar (GR4flgK). Por otro lado, la hipermovilidad que la deleción *smc00525* causa en el mutante



GR4fadD, parece ser consecuencia de estimular fundamentalmente un movimiento independiente de flagelos que es mayoritario en el fondo *fadD* de GR4, como se discutirá en el capítulo 3. Además, aunque la mutación *fadD* en GR4 favorece el desplazamiento independiente de flagelos de GR4flgK, la delección *smc00525* anula casi por completo dicho efecto. Así pues, *smc00525* influye en el desplazamiento en superficie de GR4 afectando tanto a un movimiento dependiente de flagelos característico de la cepa silvestre, como a movimientos independientes de acción flagelar que se ponen de manifiesto en mutantes *fadD* o en mutantes *flgK*. Concretamente, *smc00525* contribuye a favorecer la movilidad *swarming*, el movimiento independiente de flagelos que se pone de manifiesto en mutantes aflagelados *flgK*, y especialmente el mostrado por *fadDflgK*. Por el contrario, interfiere ligeramente con el desplazamiento independiente de flagelos de mutantes *fadD*. Conocer cuáles son los mecanismos, muy probablemente distintos, que promueven el desplazamiento en superficie de mutantes *fadD* y de mutantes *flgK* en *S. meliloti* GR4, sin duda, ayudará a generar hipótesis sobre la función de *smc00525* en movilidad en superficie.

Además de contribuir al desplazamiento en superficie, hemos demostrado que la presencia de *smc00525* afecta negativamente la formación de biopelículas sobre superficies abióticas de PVC única y exclusivamente en la cepa silvestre GR4, lo que podría sugerir que *smc00525* altera directa o indirectamente algunas de las características superficiales de esta cepa de *S. meliloti*.

*Smc00525* no parece tener influencia en las características simbióticas de las cepas Rm1021 y 1021fadD. Por el contrario, la delección del gen provoca una reducción significativa en la eficiencia de nodulación de la cepa GR4fadD, así como en la capacidad competitiva de las cepas GR4 y GR4fadD. Teniendo en cuenta que el efecto causado en movilidad por la delección en *smc00525* es distinto en esos dos fondos genéticos (reducción del *swarming* en GR4 e incremento del movimiento independiente de flagelos mostrado por GR4fadD), no hace fácil asociar los defectos simbióticos a una alteración en el comportamiento móvil de la bacteria. Una posibilidad es que la movilidad flagelar favorecida por la presencia de *smc00525* sea necesaria para conseguir una óptima capacidad competitiva al permitir a la bacteria alcanzar rápidamente los sitios de la raíz susceptibles de ser infectados. Por otro lado, contribuiría a contrarrestar un desplazamiento independiente de acción

flagelar con efectos negativos sobre la capacidad infectiva y competitiva de la bacteria. Sin embargo, ninguno de estos supuestos se ha investigado aquí.

La comparación del perfil de expresión génica global de GR4fadDΔ525 con el de GR4fadD tras crecimiento en superficie semisólida, aunque no nos ha dado una respuesta concluyente sobre la posible función que desempeña *smc00525*, sí que ha puesto de manifiesto importantes diferencias, algunas de las cuales podrían ser las responsables del distinto comportamiento simbiótico de la cepa delecionada en *smc00525*. Es llamativa la inducción en la cepa delecionada en *smc00525* de hasta 25 elementos de origen externo, grupo en el que se incluyen diversas transposasas pertenecientes a distintas secuencias de inserción presentes en el genoma de *S. meliloti*. Desconocemos las razones de la activación de la expresión de estos elementos genéticos móviles y si la misma se traduce en eventos de transposición en la cepa delecionada. Quizás el efecto de la doble mutación *fadD* y *smc00525* lleva a la bacteria a una situación de estrés extrema, a la que intenta adaptarse mediante fenómenos de reordenación genómica. Otro hecho curioso es la menor expresión en la cepa delecionada de numerosos genes relacionados con el metabolismo y captación de hierro, entre ellos, los implicados en la síntesis y captación del sideróforo Rhb1021. Estos genes se encontraron como genes inducidos en la cepa 1021fadD en respuesta al crecimiento en condiciones inductoras de movilidad en superficie, y demostramos que los genes requeridos para la síntesis de Rhb1021 son esenciales en el desplazamiento en superficie de la cepa Rm1021 (Nogales *et al.*, 2010, 2012). Curiosamente, y a diferencia de las cepas Rm1021 y 1021fadD, ni GR4 ni GR4fadD son capaces de producir Rhb1021 en ninguna de las condiciones hasta ahora ensayadas, a pesar de tener los genes requeridos para ello. Quizás el control de la expresión de los genes para la síntesis de este sideróforo, en el que *smc00525* quizás tiene alguna función, sea otra de las numerosas diferencias existentes entre GR4 y Rm1021.

Un resultado llamativo e inesperado fruto del análisis transcriptómico fue el encontrar genes *nod* diferencialmente expresados entre las cepas GR4fadD y GR4fadDΔ525. Aunque la regulación más conocida de los genes *nod* implica la activación por el regulador transcripcional NodD en respuesta a compuestos exudados por las raíces de la leguminosa, hoy se sabe que los genes *nod* comunes de *S. meliloti* también pueden expresarse en ausencia de la planta hospedadora durante el proceso de formación de biopelículas quizás como

respuesta al crecimiento sobre una superficie (Fujishige *et al.*, 2008), resultados que apuntan a la existencia de mecanismos de regulación adicionales de los genes *nod*, aún no identificados. La expresión diferencial del gen *nodD1* que apareció ligeramente inducido en la cepa GR4fadD $\Delta$ 525, y de los genes *nodP1*, *nodP2* y *nodQ2*, con menores niveles de expresión en el doble mutante comparado con la cepa GR4fadD, y la comprobación mediante RT-qPCR de la menor expresión del gen *nodP1*, nos llevó a investigar la expresión del gen *nodC* en cepas delecionadas en *smc00525*. Mediante fusiones transcripcionales hemos podido constatar que *smc00525* influye en los niveles de expresión del gen *nodC* en respuesta a luteolina, pero sólo en las cepas GR4 y GR4fadD. Investigar cómo SMc00525 afecta a la expresión de genes *nod* así como la distinta regulación de genes *nod* comunes y específicos que pudieran dar lugar a factores Nod con distinta estructura que pudieran afectar al establecimiento de la simbiosis, podrían ser objetivos para una investigación futura.



**CAPÍTULO II.**  
**ANEXOS**

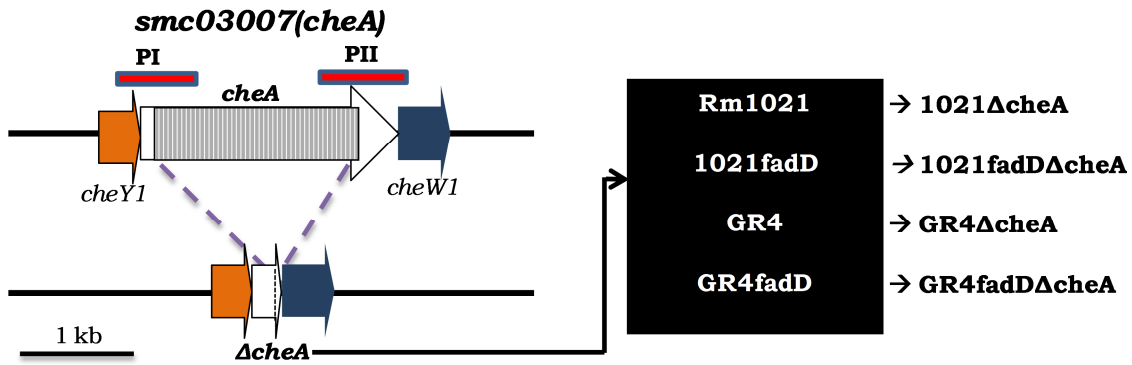


**Anexo 2.1 Construcción de mutantes en los genes *cheA*, *exoX* y *smc00525* en *Sinorhizobium meliloti* Rm1021, GR4 y sus derivados *fadD*.**Anexo 2.1.1 Construcción de mutantes en el gen *cheA* (*smc03007*) de *S. meliloti* Rm1021, GR4 y sus derivados *fadD*.

Para obtener una versión delecionada de *smc03007* en primer lugar se obtuvieron mediante PCR y usando ADN genómico de la cepa Rm1021 dos productos: utilizando los cebadores *cheA1* y *cheA2* (Tabla 4 de Materiales y Métodos) se obtuvo el producto PI de 679 pb correspondiente a la región de ADN localizada aguas arriba de la región a delecionar (fig. A2.1); con los cebadores *cheA3* y *cheA4* (Tabla 4 de Materiales y Métodos) se obtuvo el producto PII de 804 pb correspondiente a la región de ADN localizada aguas abajo de la región a delecionar (fig. A2.1). A continuación, en una nueva reacción de PCR en la que se usó como ADN molde los fragmentos PI y PII y los cebadores *cheA1* y *cheA4*, se obtuvo un producto de fusión de 1.48 Kb en el que el gen *smc03007* de 2280 pb presenta una deleción de 2093 pb.

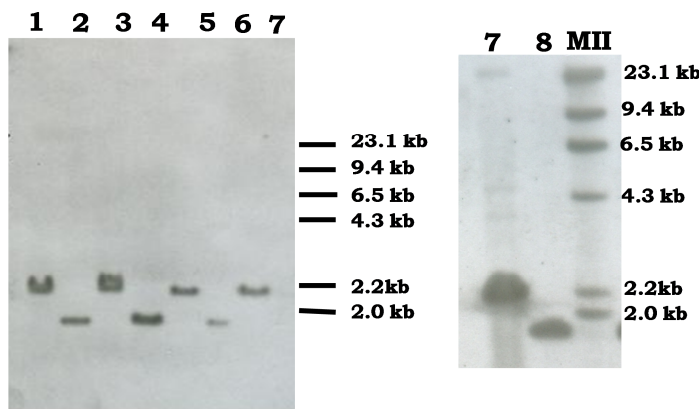
El producto de PCR generado de 1.48 Kb se clonó en pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> dando lugar al plásmido pTopo-*cheA*. La secuenciación del inserto de este plásmido con los oligos Universal y Reverso permitió comprobar que no existían alteraciones en la secuencia. Utilizando los sitios *Hind*III- *Bam*HI incluidos en los cebadores empleados para la amplificación de la versión delecionada, el inserto de 1.48 kb se subclonó en el vector suicida pK18*mobsacB* digerido *Hind*III-*Bam*HI. La construcción resultante se denominó pk18-*cheA* que se transfirió por conjugación biparental a las cepas de *S. meliloti*: Rm1021, GR4, 1021*fadD* y GR4*fadD* para la obtención de mutantes en el gen *smc03007* mediante el intercambio alélico. Al tratarse de un vector suicida, este plásmido no puede replicarse en el fondo genético de *Rhizobium*, propiedad que permite seleccionar transconjugantes Km sensibles en los que se habrá producido el correspondiente intercambio alélico. El vector pK18*mobsacB* permite una selección adicional basada en la sensibilidad a sacarosa que confiere la presencia del gen *sacB* (Schafer *et al.*, 1994).

En la figura A2.1 se muestra un esquema de la región delecionada y de la mutación resultante en *smc03007*.



**Figura A2.1.** Representación esquemática de la construcción y posterior intercambio alélico en Rm1021, GR4 y en sus respectivos derivados *fadD* de *S. meliloti* delecionados en el gen *cheA*. El alelo mutado ha sido obtenido mediante PCR solapante usando la secuencia aguas arriba (PI) y aguas abajo (PII) del gen a delecionar. La zona rayada representa la deleción del gen.

La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* utilizando como sonda la región amplificada PI de 679 pb marcada con digoxigenina (fig. A2.2). En las cepas que contienen la versión intacta de *smc03007*, la sonda hibrida con un fragmento *EcoRI* de unas 2.28 kb, mientras que en los mutantes pasa a ser de 1.8 kb por efecto de la deleción.



**Figura A2.2.** Comprobación de mutantes de *S. meliloti* delecionados en *cheA* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* y utilizando como sonda el fragmento PI. Carriles: 1.Rm1021 2.1021Δ*cheA* 3.1021fadD 4.1021fadDΔ*cheA* 5.GR4 6.GR4Δ*cheA* 7.GR4fadD 8.GR4fadDΔ*cheA*. MII: marcador de peso molecular marcado con digoxigenina.

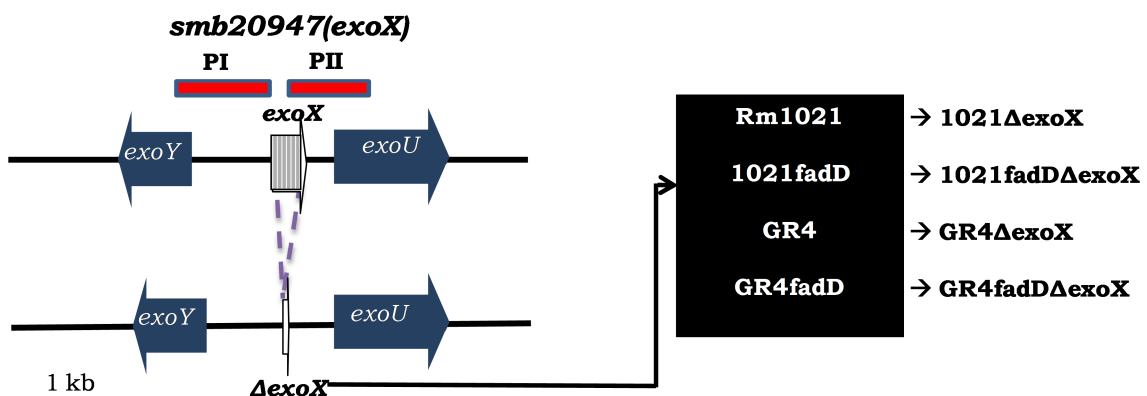
### Anexo 2.1.2 Construcción de mutantes en el gen *exoX* (*smb20947*) de *S. meliloti* Rm1021, GR4 y sus derivados *fadD*

Para obtener una versión delecionada de *smb20947* en primer lugar se obtuvieron mediante PCR y usando ADN genómico de la cepa Rm1021 dos productos: utilizando los cebadores *exoX1* y *exoX2* (Tabla 4 de Materiales y Métodos) se obtuvo el producto PI de 791pb correspondiente a la región de ADN localizada aguas arriba de la región a delecionar (fig. A2.3). Con los cebadores *exoX3* y *exoX4* (Tabla 4 de Materiales y Métodos) se obtuvo el



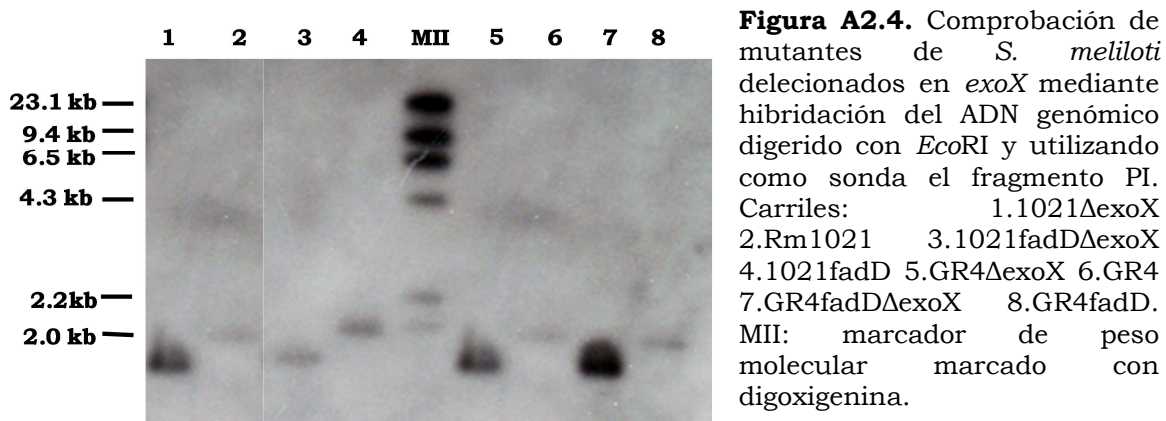
producto PII de 740pb que contiene secuencias aguas abajo del gen *smb20947*. A continuación, en una nueva reacción de PCR en la que se usó como ADN molde los fragmentos PI y PII y los cebadores *exoX1* y *exoX4*, se obtuvo un producto de fusión de 1.53 Kb en el que el gen *smb20947* de 296 pb presenta una deleción de 274 pb.

El producto de PCR generado de 1.53 Kb se clonó en pCR®-XL-TOPO® dando lugar al plásmido pTopo-*exoX*. La secuenciación del inserto de este plásmido con los oligos Universal y Reverso permitió comprobar que no existían alteraciones en la secuencia. Utilizando los sitios *HindIII*-*BamHI* incluidos en los cebadores empleados para la amplificación de la versión delecionada, el inserto de 1.53 kb se subclonó en el vector suicida pK18*mobsacB* digerido *HindIII*-*BamHI*. La construcción resultante se denominó pk18-*exoX* que se transfirió por conjugación biparental a las cepas de *S. meliloti*: Rm1021, GR4, 1021*fadD* y GR4*fadD*, seleccionándose el intercambio alélico en el gen *exoX* como se ha descrito para los mutantes *cheA*. En la figura A2.3 se muestra un esquema de la región delecionada y de la mutación resultante en *smb20947*.



**Figura A2.3.** Representación esquemática de los genes que flanquean a *smb20947* y cómo se han construido los mutantes por deleción en el gen *exoX*. Se representa también el intercambio alélico en los fondos Rm1021, GR4 y en sus respectivos derivados *fadD* de *S. meliloti* delecionados en el gen *exoX*. El alelo mutado ha sido obtenido mediante PCR solapante usando la secuencia aguas arriba (PI) y aguas abajo (PII) del gen a delecionar. La zona rayada representa la deleción del gen.

La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *NotI* utilizando como sonda la región amplificada PI de 791pb marcada con digoxigenina (fig. A2.4) En las cepas que contienen la versión intacta de *smb20947*, la sonda hibrida con un fragmento *NotI* de 2kb en la parental, mientras que en los mutantes pasa a ser de 1.7 kb por efecto de la deleción.

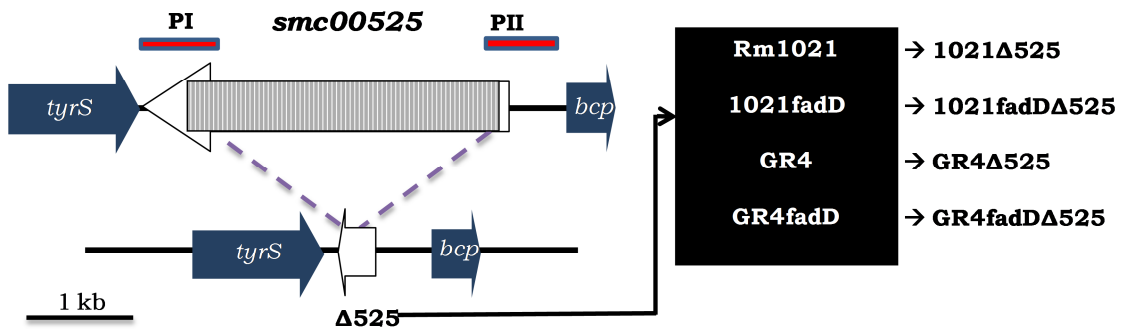


Anexo 2.1.3 Construcción de mutantes en el gen *smc00525* de *S. meliloti* Rm1021, GR4 y sus derivados *fadD*.

Para obtener una versión delecionada de *smc00525* en primer lugar se obtuvieron mediante PCR y usando ADN genómico de la cepa Rm1021 dos productos: utilizando los cebadores 0C5251 y 0C5252 (Tabla 4 de Materiales y Métodos) se obtuvo el producto PI de 701pb correspondiente a la región de ADN localizada aguas arriba de la región a delecionar (fig. A2.5); con los cebadores 05253 y 05254 (Tabla 4 de Materiales y Métodos) se obtuvo el producto PII de 680 pb correspondiente a la región de ADN localizada aguas abajo de la región a delecionar (fig. A2.5). A continuación, en una nueva reacción de PCR en la que se usó como ADN molde los fragmentos PI y PII y los cebadores 05251 y 05224, se obtuvo un producto de fusión de 1.38 Kb en el que el gen *smc00525* de 3467 pb presenta una deleción de 3093 pb.

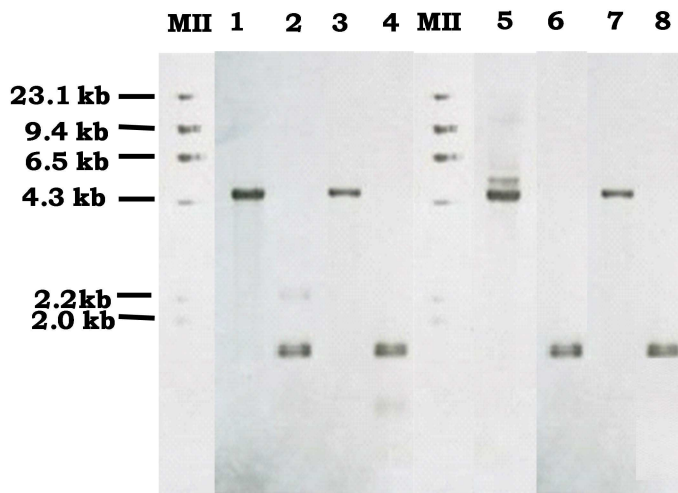
El producto de PCR generado de 1.38 Kb se clonó en pCR®-XL-TOPO® dando lugar al plásmido pTopo-525. La secuenciación del inserto de este plásmido con los oligos Universal y Reverso permitió comprobar que no existían alteraciones en la secuencia. Utilizando los sitios *HindIII*- *BamHI* incluidos en los cebadores empleados para la amplificación de la versión delecionada, el inserto de 1.38 kb se subclonó en el vector suicida pK18*mobsacB* digerido *HindIII*-*BamHI*. La construcción resultante se denominó pk18-525 que se transfirió por conjugación biparental a las cepas de *S. meliloti*: Rm1021, GR4, 1021*fadD* y GR4*fadD* para la obtención de mutantes en el gen *smc00525* mediante el intercambio alélico, de la misma forma a la indicada para la obtención de los mutantes *cheA*.

En la figura A2.5 se muestra un esquema de la región delecionada y de la mutación resultante en *smc00525*.



**Figura A2.5.** Representación esquemática de los genes que flanquean a *smc00525* y cómo se han construido los mutantes por deleción en dicho gen. Se representa también el intercambio alélico en los fondos Rm1021, GR4 y en sus respectivos derivados *fadD* de *S. meliloti* delecionados en el gen *smc00525*. El alelo mutado ha sido obtenido mediante PCR solapante usando la secuencia aguas arriba (PI) y aguas abajo (PII) del gen a delecionar. La zona rayada indica la deleción sufrida por el gen.

La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* utilizando como sonda la región amplificada PI de 701pb marcada con digoxigenina (fig. A2.6) En las cepas que contienen la versión intacta de *smc00525*, la sonda hibrida con un fragmento *EcoRI* de unas 4.7kb, mientras que en los mutantes pasa a ser de 1.67kb por efecto de la deleción.

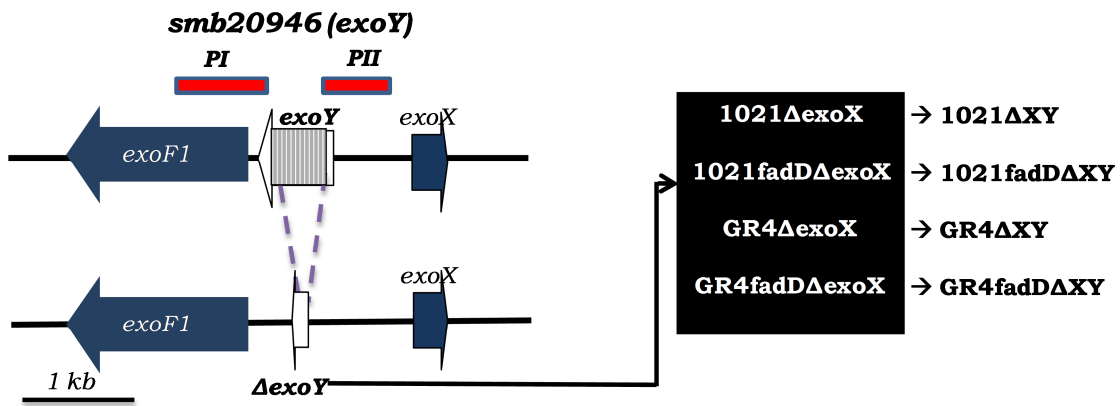


**Figura A2.6.** Comprobación de mutantes de *S. meliloti* delecionados en *smc00525* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* y utilizando como sonda el fragmento PI. Carriles: 1.Rm1021 2.1021 $\Delta$ 525 3.1021fadD 4.1021fadD $\Delta$ 525 5.GR4 6.GR4 $\Delta$ 525 7.GR4fadD 8.GR4fadD $\Delta$ 525. MII: marcador de peso molecular marcado con digoxigenina.

**Anexo 2.2 Construcción de mutantes en el gen *exoY* en 1021 $\Delta$ *exoX*, GR4 $\Delta$ *exoX* y sus derivados *fadD*.**

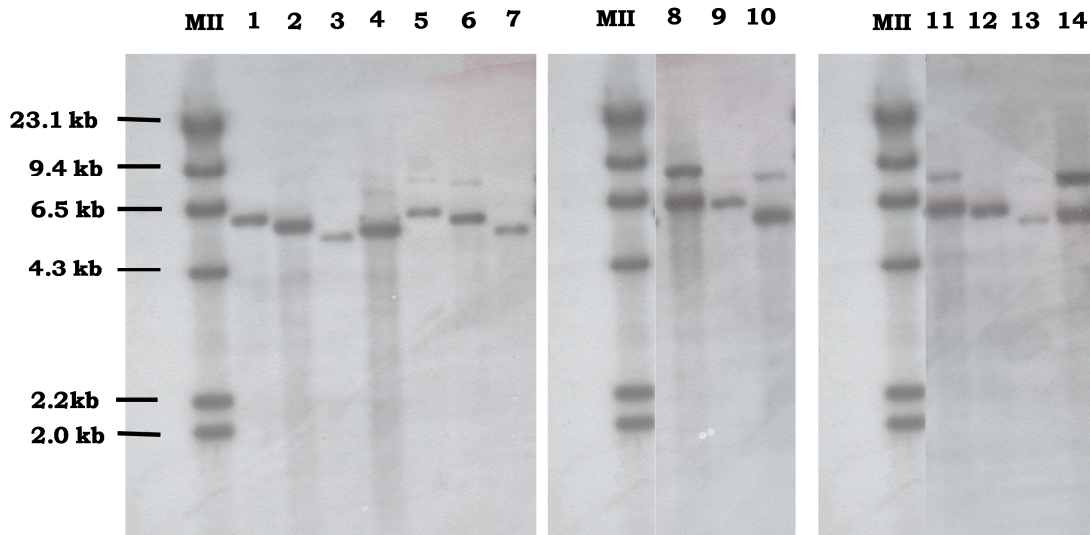
De igual modo a todos los mutantes anteriores, la versión delecionada de *exoY* se obtuvo siguiendo la técnica de PCR solapante ya descrita. Para la construcción de estos mutantes se usó el ADN genómico de la cepa Rm1021 y los cebadores *exoY1* y *exoY2* (Tabla 4 de Materiales y Métodos) y se obtuvo el producto PI de 836 pb correspondiente a la región de ADN localizada aguas arriba de la región a delecionar (fig. A2.7); mientras que con los cebadores *exoY3* y *exoY4* (Tabla 4 de Materiales y Métodos) se obtuvo el producto PII de 610 pb correspondiente a la región de ADN localizada aguas abajo de la región a delecionar (fig. A2.7). A continuación, en una nueva reacción de PCR en la que se usó como ADN molde los fragmentos PI y PII y los cebadores *exoY1* y *exoY4*, se obtuvo un producto de fusión de 1.44 Kb en el que el gen *exoY* de 1900 pb presenta una deleción de 500 pb.

El producto de PCR generado de 1.44 Kb se clonó en pCR<sup>®</sup>-XL-TOPO<sup>®</sup> dando lugar al plásmido pTopo-*exoY*. La secuenciación del inserto de este plásmido con los oligos Universal y Reverso permitió comprobar que no existían alteraciones en la secuencia. Utilizando los sitios *Bam*III incluidos en los cebadores empleados para la amplificación de la versión delecionada, el inserto de 1.44 kb se subclonó en el vector suicida pK18*mobsacB* digerido *Bam*HI. La construcción resultante se denominó pk18-*exoY* que se transfirió por conjugación biparental a las cepas de *S. meliloti*: 1021 $\Delta$ *exoX*, GR4 $\Delta$ *exoX*, 1021*fadD* $\Delta$ *exoX* y GR4*fadD* $\Delta$ *exoX* para la obtención de mutantes en el gen *smb20946* mediante el intercambio alélico.



**Figura A2.7.** Representación esquemática de cómo se han construido los mutantes por deleción en el gen *smb20946 (exoY)*. Se representa también el intercambio alélico en los correspondientes fondos. El alelo mutado ha sido obtenido mediante PCR solapante usando la secuencia aguas arriba (PI) y aguas abajo (PII) del gen a delecionar. La zona rayada indica la deleción del gen.

La mutación se verificó en los correspondientes transconjugantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *EcoRI* y *PstI* utilizando como sonda las regiones PI marcada con digoxigenina (fig. A2.8) En las cepas que contienen la versión intacta de *smb20946* y *smb20947*, la sonda hibrida con un fragmento *EcoRI* y *PstI* de 5.96 kb, mientras que en los mutantes  $\Delta$ exoXY pasa a ser de 5.1 kb por efecto de ambas deleciones.



**Figura A2.8.** Comprobación de mutantes de *S. meliloti* delecionados en en el gen *exoY* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* y *PstI*. Carriles: 1. Rm1021 2.1021 $\Delta$ exoX 3.1021 $\Delta$ X-Y 4.1021 $\Delta$ exoY 5.1021fadD 6.1021fadD $\Delta$ exoX 7.1021fadD $\Delta$ XY 8.GR4 9.GR4 $\Delta$ exoX 10.GR4 $\Delta$ XY 11.GR4fadD 12.GR4fadD $\Delta$ exoX 13.GR4fadD $\Delta$ XY 14.GR4fadD $\Delta$ exoY MII: marcador de peso molecular marcado con digoxigenina.

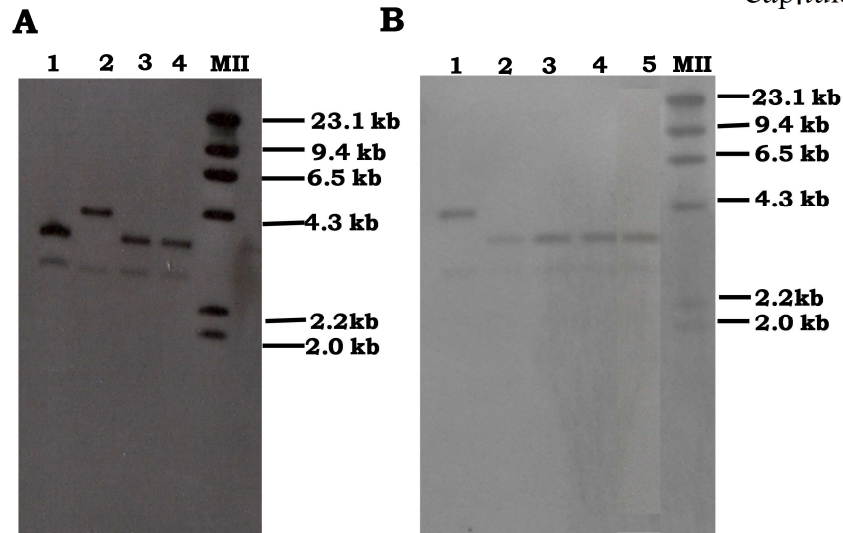
### **Anexo 2.3. Construcción de mutantes afectados en los genes *flaAB* y *flgK*.**

#### Anexo 2.3.1. Construcción de mutantes *flaA flaB (flaAB)*.

Para la obtención de los mutantes con la versión deletada de *flaAB* se realizó una transducción de la mutación *flaAflaB::Hyg* desde la cepa 1021*flaAB* (Nogales *et al.*, 2012) a 1021 $\Delta$ exoX.

En el caso de los mutantes GR4*flaAB*, GR4fadD*flaAB*, GR4 $\Delta$ 525*flaAB* y GR4fadD $\Delta$ 525*flaAB* al no poder emplear la misma estrategia, se procedió a digerir la cepa 8530*flaAB* con la enzima de restricción *Bgl*III. Posteriormente, se clonó el fragmento *Bgl*III Hyg<sup>R</sup> de 3.3 kb en el vector pUC18, digerido con *Bam*HI (en esta clonación se pierden los sitios *Bgl*III y *Bam*HI). El plásmido resultante (pUC18-*flaAB::Hyg*), fue digerido con *Hind*III (enzima que corta en el vector, pero no en el inserto) y posteriormente subclonado en pK18*mobsacB*. La construcción resultante se denominó pK18-pUC18-*flaAB::Hyg* que se transfirió por conjugación biparental a las cepas de *S. meliloti*: GR4, GR4fadD, GR4 $\Delta$ 525 y GR4fadD $\Delta$ 525 para la obtención de los mutantes en *flaAB* mediante el intercambio alélico de la misma forma a la indicada para la obtención de los mutantes *cheA*.

La mutación se verificó en los correspondientes mutantes mediante hibridación de su ADN genómico digerido con *Bgl*III utilizando como sonda una región amplificada (PI de 882 pb) con la secuencia aguas arriba de los genes *flaAflaB* y posteriormente marcada con digoxigenina. Dicha región fue obtenida mediante PCR tras usar ADN genómico de la cepa Rm1021 con los cebadores  $\Delta$ *flaAB*.1 y  $\Delta$ *flaAB*.2. En las cepas que contienen la versión intacta de estos genes flagelares, la sonda hibrida con un fragmento *Bgl*III de unas 4.2 kb y con otro de 2.8 kb más tenue, mientras que en los mutantes pasa a ser de 3.3 kb por efecto de la deleción quedándose intacto el fragmento de 2.8 kb (fig. A2.9).



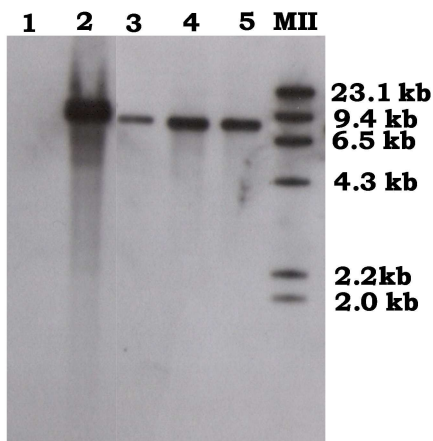
**Figura A2.9.** Comprobación de mutantes afectados en los genes *flaA* *flaB* derivados de Rm1021 (A) y de GR4 (B) mediante hibridación del ADN genómico digerido con *Bgl*III. Carriles: (A) 1.Rm11601 (Rm8530*flaAflaB*) 2.Rm1021 3.1021*flaAB* 4.1021Δ*exoXflaB* (B) 1.GR4 2.GR4*flaAB* 3.GR4Δ525*flaAB* 4.GR4*fadDflaAB* 5.GR4*fadD*Δ525*flaAB*. MII: marcador de peso molecular marcado con digoxigenina.

#### Anexo 2.3.2. Construcción de mutantes *flgK*.

Para la obtención de mutantes afectados en este gen partimos de la construcción pUCGNS5 (Amaya-Gómez 2009) constituido por el vector pUC18 con el fragmento de 8.5Kb *Eco*RI que contiene la inserción del Tn5 del mutante GNS5 (GR4FDCSS*flgK*::Tn5) obtenido en la mutagénesis llevada a cabo en el capítulo I de este trabajo.

Se procedió a la digestión de dicha construcción con *Eco*RI y a la extracción de la banda del inserto. Paralelamente se llevó a cabo la digestión del plásmido pSUP202 con la misma enzima y, una vez extraído el inserto, se procedió a su ligación. Finalmente se transfirió por conjugación a las cepas de *S. meliloti*: GR4, GR4Δ525, GR4*fadD* y GR4*fadD*Δ525 para la obtención de mutantes GR4*flgK*, GR4Δ525*flgK* y GR4*fadD*Δ525*flgK* mediante el intercambio alélico, seleccionando transconjugantes Km resistentes en los que se habrá producido el correspondiente intercambio alélico. Finalmente se comprobó la mutación mediante hibridación (figura A2.10) de su ADN genómico digerido con *Eco*RI utilizando una sonda específica para el transposón.





**Figura A2.10.** Comprobación de los mutantes *flgK* mediante hibridación del ADN genómico de los transjugantes que han sido digeridos con *EcoRI* usando una sonda correspondiente al transposón. Carriles: 1.GR4 (cepa parental, ausencia del Tn5), 2.GNS5 (GR4FDCSSflgK::Tn5), 3.GR4flgK, 4.GR4Δ525flgK, 5.GR4fadDΔ525flgK. MII, Marcador II de peso molecular conocido marcado con digoxigenina.

**Anexo 2.4. Análisis transcriptómico de células del mutante GR4fadDΔ525 crecidas en medio mínimo semisólido.**

El listado de genes diferencialmente expresados en un mutante GR4fadDΔ525 frente a GR4fadD tras crecimiento en medio mínimo semisólido, se muestra en las tablas A1 y A2.

**Tabla A1.** Listado de genes más expresados en el mutante GR4fadDΔ525 frente al mutante simple GR4fadD. Se indica el nombre del gen junto con una breve descripción de éste y el valor de M obtenido de los microarrays en orden decreciente.

Gen	Descripción	Valor de M
<i>smc03253</i>	Putative l proline 3 hydroxylase protein	8,71883028
<i>sma1082</i>	Hypothetical protein	6,37430622
<i>smc03252</i> ( <i>proB2</i> )	Putative glutamate 5 kinase protein	6,31109104
<i>smb21177</i> ( <i>phoC</i> )	Phosphate uptake ABC transporter ATP binding protein	6,20481068
<i>smb21176</i> ( <i>phoD</i> )	Phosphate uptake ABC transporter periplasmic solute binding protein precursor	5,97600639
<i>smc01419</i> ( <i>rpoE1</i> )	Probable RNA polymerase sigma factor protein	5,90614822
<i>smc02146</i>	Putative phosphate binding periplasmic protein	5,87379708
<i>sma0471</i>	Conserved hypothetical protein	5,73258096
<i>sma2037</i>	Putative oxidoreductase	5,66624208
<i>smc03251</i>	Hypothetical protein	5,55305578
<i>sma0312</i>	Hypothetical protein	5,35574896
<i>sma0314</i>	Hypothetical protein	5,31171676
<i>smc01420</i>	Hypothetical transmembrane protein	5,3073211
<i>smc03246</i>	Putative integrase DNA protein	5,26490745



<i>smc02634</i>	Hypothetical transmembrane protein	5,24352496
<i>sma1927</i>	Conserved hypothetical protein	5,23430803
<i>smb20824</i>	Putative membrane protein, slightly similar to carrier proteins	5,22609304
<i>smc02079</i>	Putative outer membrane protein	5,06247885
<i>smc01907</i>	Hypothetical transmembrane protein	5,03899336
<i>smb21175 (phoE)</i>	Phosphate uptake ABC transporter permease protein	4,90780428
<i>smc01022</i>	Putative cytochrome B transmembrane protein	4,84398575
<i>smc02145</i>	Hypothetical signal peptide protein	4,82257545
<i>smc02156</i>	Conserved hypothetical protein	4,80039295
<i>sma2245</i>	Conserved hypothetical protein	4,76719363
<i>smc03269</i>	Putative peptide binding periplasmic ABC transporter protein	4,7452759
<i>sma0506</i>	Putative ABC transporter, periplasmic solute binding protein, family 3	4,68825901
<i>smc02187 (int)</i>	Putative integrase DNA protein	4,67688578
<i>smc02151</i>	Conserved hypothetical protein	4,64391936
<i>smc02296 (hsdM)</i>	Putative modification enzyme transmembrane protein	4,6341303
<i>smb21234</i>	TRm1a probable transposase of insertion sequence ISRm1 orfA protein	4,58974403
<i>sma0439</i>	Hypothetical protein	4,56165123
<i>sma1706</i>	Hypothetical protein	4,55967788
<i>smc04051 (rpoE4)</i>	Putative RNA polymerase sigma E factor (sigma 24) protein	4,4506544
<i>sma1990</i>	Conserved hypothetical protein	4,43085156
<i>smc00185</i>	Putative ABC transporter ATP binding transmembrane protein	4,38841115
<i>smc02202</i>	Hypothetical protein	4,32809523
<i>smc02155</i>	Hypothetical protein	4,32200851
<i>smc03114</i>	TRm3 transposase for insertion sequence element ISRM3	4,29986024
<i>smc02326</i>	Hypothetical protein	4,29816414
<i>sma0359</i>	Hypothetical protein	4,29790837
<i>smc04195</i>	TRm3 transposase for insertion sequence element ISRM3	4,27451808
<i>sma1136</i>	Hypothetical protein	4,26220701
<i>smc02203</i>	Conserved hypothetical protein	4,2525755
<i>smc04291</i>	Putative L sorbosone dehydrogenase (SNDH) protein	4,24212236
<i>smc03761</i>	Hypothetical protein	4,17551549
<i>smc01418</i>	Hypothetical signal peptide protein	4,16816402
<i>sma0496</i>	Conserved hypothetical protein	4,10673235
<i>smc01421</i>	Hypothetical protein	4,09770251
<i>sma0976</i>	TRm3 transposase fragment	4,06454955
<i>smb20835</i>	Conserved hypothetical protein	4,03221989
<i>sma1760</i>	Hypothetical protein	4,02903005
<i>sma0673</i>	TRm3 transposase	4,01017468
<i>smb20825</i>	Putative acetyltransferase, <i>cysElacA/lpxA/nodL</i>	4,0079482

	family protein	
<i>smc03898</i>	TRm1a transposase for insertion sequence element ISRM1	3,99781033
<i>sma0384</i>	TRm3 transposase	3,98763486
<i>smc04429</i>	Hypothetical protein	3,94675161
<i>smb20906</i>	Hypothetical protein	3,93429522
<i>smc03766</i>	Hypothetical protein	3,91277077
<i>sma1356</i>	TRm3 transposase	3,88530313
<i>smc02295</i> ( <i>hsdS</i> )	Putative specificity protein S	3,88507214
<i>smc03283</i>	TRm18 putative transposase for insertion sequence ISRM18	3,88208361
<i>smc02152</i>	Putative helicase protein	3,87838609
<i>smc03754</i>	Putative peptide transport system permease ABC transporter protein	3,86656588
<i>sma0444</i>	TRm1b transposase	3,85945323
<i>smc03765</i>	Hypothetical protein	3,85774386
<i>smc02839</i>	TRm3 transposase for insertion sequence element ISRM3	3,84514126
<i>smc01848</i>	Conserved hypothetical protein	3,832714
<i>smc02298</i>	TRm1a transposase for insertion sequence element ISRM1	3,76136294
<i>smc04317</i>	ABC transporter, periplasmic solute-binding component	3,75237693
<i>sma0473</i>	Conserved hypothetical protein	3,72976022
<i>smc04050</i>	Hypothetical transmembrane protein	3,71908913
<i>sma2243</i>	Hypothetical protein	3,68767549
<i>smb21174</i> ( <i>phoT</i> )	Phosphate uptake ABC transporter permease	3,68432765
<i>sma0461</i>	TRm3 transposase	3,52148366
<i>smb21285</i>	Conserved hypothetical protein, transthyretin like protein	3,48524288
<i>sma1134</i>	Hypothetical protein	3,37358055
<i>sma2227</i>	Putative histidine utilization repressor protein	3,35780498
<i>smb20909</i>	Hypothetical protein	3,30592795
<i>smc00033</i>	Diguanylate cyclase/phosphodiesterase	3,22694165
<i>smc02345</i>	Putative transport system permease ABC transporter protein	3,19526594
<i>sma1761</i>	Putative aminotransferase	3,12371244
<i>smc00819</i> ( <i>katA</i> )	Catalase hydroperoxidase HP11(III) protein	3,08485867
<i>smb20025</i>	Conserved hypothetical protein	3,0367867
<i>smc03892</i>	TRm21 putative transposase protein	3,03276012
<i>smc01609</i> ( <i>ribH2</i> )	Putative 6,7 dimethyl 8 ribityllumazine synthase protein	2,98602755
<i>sma1103</i>	Probable adenylate cyclase	2,95214884
<i>sma0548</i>	Conserved hypothetical protein	2,95195904
<i>smc02344</i>	Putative periplasmic binding protein	2,91733954
<i>smc01847</i>	Putative methyltransferase protein	2,89582169
<i>sma0967</i>	Hypothetical protein	2,89404337

<i>smb20696</i>	Hypothetical protein	2,86905592
<i>smc03124</i>	Putative periplasmic binding ABC transporter protein	2,86145298
<i>smc03254 (fixT3)</i>	Putative antikinase protein	2,80423198
<i>sma1029</i>	TRm1b transposase	2,78488096
<i>sma1001</i>	Hypothetical protein	2,60867644
<i>sma0005 (fdoH)</i>	Probable fdoH formate dehydrogenase, beta subunit	2,60059646
<i>smc03296</i>	TRm1b transposase for insertion sequence element ISRM1	2,57252609
<i>sma0118</i>	Hypothetical protein	2,53717426
<i>sma1770</i>	Hypothetical protein	2,52317976
<i>sma0739</i>	Hypothetical protein	2,50639186
<i>smc04335</i>	Hypothetical lipoprotein transmembrane	2,47191226
<i>sma2059</i>	Hypothetical protein	2,45686513
<i>smc04165</i>	Putative oxidoreductase protein	2,45128475
<i>smc03113</i>	TRm5N partial transposase for insertion sequence element ISRM5	2,45031424
<i>smc01111 (int)</i>	Apolipoprotein N-acyltransferase (acid-inducible gene) transmembrane	2,39848897
<i>smc00777</i>	Conserved hypothetical protein	2,31028913
<i>sma1755</i>	Putative ABC transporter, periplasmic solute binding protein	2,30528419
<i>sma1008</i>	Hypothetical protein	2,30142376
<i>sma1132</i>	Hypothetical protein	2,28278186
<i>smc02142 (pstB)</i>	Probable phosphate transport ATP binding ABC transporter protein	2,2577663
<i>smc01242</i>	Signal peptide protein	2,24689719
<i>smb21171 (phnM)</i>	Putative enzyme protein	2,22050899
<i>sma1759</i>	Putative GntR family transcriptional regulator	2,21334826
<i>smb20605</i>	Putative ureashort chain amide or branched chain amino acid uptake ABC transporter periplasmic solute binding protein precursor	2,19496339
<i>sma2107</i>	Probable GstR transcriptional regulator	2,19186038
<i>smb21292</i>	Conserved hypothetical membrane protein, paralogue of Y20848	2,18300941
<i>sma0580</i>	Hypothetical protein	2,1265985
<i>smc02141 (phoU)</i>	Probable phosphate transport system transcriptional regulator protein	2,1175882
<i>smb20348</i>	Hypothetical protein	2,11378564
<i>smc03099 (cyaF1)</i>	Putative adenylate cyclase protein	2,03699371
<i>sma0241</i>	Conserved hypothetical protein	2,03157009
<i>smb21707</i>	Putative ureashort chain amide or branched chain amino acid uptake ABC transporter ATP binding protein	2,0221933
<i>smc02140 (phoB)</i>	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein	2,01777346
<i>sma0134</i>	Hypothetical protein	2,01542045
<i>sma1147</i>	Conserved hypothetical protein	1,98161548

<i>smc01535</i>	Hypothetical protein	1,97583019
<i>sma2020</i>	Putative transcription regulator	1,95031798
<i>smc00186</i>	Putative ABC transporter ATP binding transmembrane protein	1,94374485
<i>smc00965</i>	Conserved hypothetical protein	1,93044802
<i>smb20352</i>	Probable sugar ABC transporter permease protein	1,92440449
<i>smb20628</i>	Conserved hypothetical protein	1,91704929
<i>smc03130</i>	Conserved hypothetical protein	1,90456846
<i>sma0142</i>	Possible protease	1,90262077
<i>sma0633</i>	Hypothetical protein	1,89004818
<i>smb20603</i>	Putative ureashort chain amide or branched chain amino acid uptake ABC transporter permease protein	1,86067961
<i>smb20161</i>	Hypothetical protein	1,8145884
<i>smc04049</i>	Putative sulfite oxidase protein	1,79580196
<i>smc03157</i>	Putative outer membrane lipoprotein transmembrane	1,78631852
<i>sma2347</i>	Conserved hypothetical protein	1,78522481
<i>smb21286 (xdhA1)</i>	Probable xanthine dehydrogenase protein	1,78321889
<i>sma0252</i>	Conserved hypothetical protein	1,75711181
<i>smc00964</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,75543064
<i>smb20604</i>	Putative ureashort chain amide or branched chain amino acid uptake ABC transporter permease protein, possibly fusion protein	1,75230852
<i>smb20627</i>	Conserved hypothetical protein	1,74910726
<i>smc02143 (PstA)</i>	Putative phosphate transport system permease ABC transporter protein	1,69189494
<i>sma1635</i>	Hypothetical protein	1,69097051
<i>sma1894</i>	Hypothetical protein	1,68285156
<i>smc02144 (pstC)</i>	Probable phosphate transport system permease ABC transporter protein	1,67612925
<i>smc04194</i>	Putative transmembrane protein	1,67118458
<i>sma1010</i>	Hypothetical protein	1,66270196
<i>smc01127</i>	Conserved hypothetical protein	1,660234
<i>sma0391</i>	Putative ABC transporter, ATP binding protein	1,64849767
<i>smb20354</i>	Hypothetical protein	1,63050403
<i>smb20838</i>	Putative secreted calcium binding protein	1,6288969
<i>smb20872</i>	Conserved hypothetical protein, transthyretin like protein	1,62653027
<i>smb21440</i>	Hypothetical protein	1,61661752
<i>sma0585 (nrtA)</i>	Nitrate transporter, periplasmic nitrate transport binding protein.	1,61362598
<i>smc03799</i>	Conserved hypothetical protein	1,59296785
<i>smc01810</i>	Conserved hypothetical protein	1,57663481
<i>sma0113</i>	Sensory transduction histidine kinase that regulates succinate-mediated catabolite repression.	1,57528271
<i>sma0247</i>	Hypothetical protein	1,57307738

<i>smc03091 (argI1)</i>	Probable arginase protein	1,56274897
<i>smb21170</i>	Putative guanylate kinase, also similar to <i>E. coli</i> PhnN protein	1,54761289
<i>smc01557</i>	Hypothetical signal peptide protein	1,53919802
<i>sma1131</i>	Conserved hypothetical protein	1,53455616
<i>sma0235</i>	Putative dihydroxy acid dehydratase	1,52536744
<i>sma1808</i>	Hypothetical protein	1,51805772
<i>smc01159</i>	Putative oxidoreductase protein	1,51788616
<i>smc04048</i>	Putative cytochrome-C protein	1,51654146
<i>smb21479</i>	Hypothetical protein	1,48931546
<i>sma1226 (fixT1)</i>	Inhibitor of FixL autophosphorylation	1,48864189
<i>smb20393 (rbcL)</i>	Putative ribulose biphosphate carboxylaseoxygenase, large subunit protein	1,48742048
<i>smc03769</i>	Putative protease transmembrane protein	1,48379381
<i>sma1355</i>	Conserved hypothetical protein	1,47601938
<i>smc02840</i>	TRm5N, partial transposase for insertion sequence element ISRM5	1,47538298
<i>sma0180</i>	Conserved hypothetical protein	1,46482018
<i>sma0896</i>	Conserved hypothetical protein	1,46389646
<i>smc00618 (ppk)</i>	Putative polyphosphate kinase protein	1,442863
<i>sma0763</i>	Hypothetical protein	1,4088172
<i>smb20884</i>	Hypothetical protein	1,40501837
<i>sma0693 (arcA1)</i>	Arginine deiminase	1,40135194
<i>smc01240</i>	TRm5,transposase for insertion sequence element ISRM5	1,3986927
<i>smc04322 (mocA)</i>	Putative oxidoreductase protein	1,39846438
<i>smc01723</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,39296512
<i>smc02716</i>	Conserved hypothetical protein	1,39031162
<i>sma0636</i>	Conserved hypothetical protein	1,38413323
<i>sma0667</i>	Hypothetical protein	1,38344669
<i>smb21655 (lacZ1)</i>	Probable beta galactosidase protein	1,37880136
<i>smb20761 (phnI)</i>	Putative C-P (carbon phosphorus) lyase component protein	1,37716534
<i>sma0581</i>	Nitrate transport ATP binding protein, probable	1,35744709
<i>sma1821</i>	Conserved hypothetical protein	1,35611452
<i>sma1501</i>	Hypothetical protein	1,35175798
<i>smb21236</i>	Putative ATP/GTP binding protein	1,34698803
<i>sma0783</i>	Conserved hypothetical protein	1,34534755
<i>sma1358</i>	Hypothetical protein	1,34026371
<i>smc04456 (csaA)</i>	Putative chaperone protein	1,33583507
<i>smb20935 (exsI)</i>	Putative transcriptional regulator protein	1,3268283
<i>sma1754</i>	Putative ABC transporter, ATP binding protein	1,32242765
<i>smb20834 (rkpZ1)</i>	Probable surface saccharide synthesis protein, possibly involved in chain length determination	1,3146991
<i>smc01216</i>	Hypothetical protein	1,30953967

<i>smb20284</i>	Putative ABC transporter periplasmic spermidine putrescine binding protein	1,30466678
<i>smc01160</i>	Conserved hypothetical protein	1,29564088
<i>smb20278</i>	Hypothetical protein	1,28704012
<i>smb21487 (cyoA)</i>	Putative cytochrome o ubiquinol oxidase chain II protein	1,28602747
<i>sma0237</i>	Putative D-threonine	1,27427029
<i>sma1497 (gst12)</i>	putative glutathione S-transferase	1,26727983
<i>smb20600</i>	Hypothetical protein	1,26667081
<i>smb20279</i>	Hypothetical protein	1,26568919
<i>smb21579 (hmrR2)</i>	Putative transcriptional regulator, <i>merR</i> family protein	1,26341626
<i>smc01650</i>	Putative esterase/lipase protein	1,26309036
<i>smc01466</i>	TRm21 putative transposase protein	1,26165063
<i>smc01504</i>	Putative receiver domain protein	1,25698358
<i>sma1767</i>	Hypothetical protein	1,25243145
<i>smc00286</i>	Hypothetical hemolysin type calcium binding protein	1,24836781
<i>sma0538</i>	Hypothetical protein	1,23199961
<i>sma1881</i>	Hypothetical protein	1,2284561
<i>smb20281</i>	Probable spermidine-putrescine ABC transporter ATP binding protein	1,22287518
<i>sma2375</i>	TRm2011 2b transposase	1,21729259
<i>sma1089</i>	Hypothetical protein	1,21683229
<i>smc00255</i>	Hypothetical protein	1,20278633
<i>sma0583 (nrtB)</i>	Nitrate transport permease protein	1,20276956
<i>smb21494 (ocd)</i>	Putative ornithine cyclodeaminase protein	1,1938197
<i>smc00640 (serC)</i>	Putative phosphoserine aminotransferase protein	1,192759
<i>smb20647</i>	Hypothetical protein	1,1917277
<i>sma0229</i>	Hypothetical protein	1,17812641
<i>smb20765</i>	Putative acetyltransferase protein	1,17406135
<i>smc04239</i>	Hypothetical protein	1,1532291
<i>smc02897</i>	Putative cytochrome c transmembrane protein	1,15248611
<i>sma0870 (nodD1)</i>	Transcription regulator	1,13726204
<i>smc00156</i>	Conserved hypothetical protein	1,12838054
<i>smb20814</i>	Putative protein	1,12679265
<i>smb21676</i>	Hypothetical protein	1,12415675
<i>sma1043</i>	Hypothetical protein	1,12253964
<i>smc00592</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,11997901
<i>smc00409</i>	Hypothetical signal peptide protein	1,10881222
<i>smb20280</i>	Hypothetical protein	1,10301194
<i>smc01021</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,10201658
<i>smc01493</i>	Conserved hypothetical protein	1,09995644
<i>smb20885</i>	Conserved hypothetical membrane protein	1,08912419
<i>sma0811 (fdxN)</i>	Ferredoxin	1,083725
<i>smc01525 (dppa2)</i>	Putative dipeptide binding periplasmic protein	1,07607087

<i>smc03032 (flgI)</i>	Flagellar P-ring precursor transmembrane protein	1,07439925
<i>smc02300</i>	TRm30.4 putative transposase number 4 for insertion sequence ISRM30	1,06925569
<i>smb20273</i>	Hypothetical protein	1,06142926
<i>smb20282</i>	Probable spermidine-putrescine ABC transporter permease protein	1,05588362
<i>smb20560</i>	Conserved hypothetical protein	1,05486197
<i>smc00830</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,05042048
<i>smc02407</i>	Conserved hypothetical protein	1,04967393
<i>smc01290 (rplO)</i>	Probable 50s ribosomal protein	1,04132063
<i>smc01524</i>	Putative dipeptidase protein	1,03865777
<i>smb21454</i>	Hypothetical protein	1,03258481
<i>smb21441</i>	Putative inosine-5'-monophosphate dehydrogenase protein	1,03174077
<i>smc01776</i>	Putative auxin binding protein	1,031525
<i>smc04381</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,00720872
<i>sma0785</i>	Putative site specific recombinase	1,00637432
<i>smb21427</i>	Putative acetyltransferase protein	1,00626396
<i>smc03802</i>	Conserved hypothetical protein	1,00610345
<i>smc02552</i>	Hypothetical unknown protein	1,00269473
<i>smc04206</i>	Putative hemolysin type calcium binding protein	1,0011733

**Tabla A2.** Listado de genes menos expresados en el mutante GR4fadD $\Delta$ 525 frente al mutante simple GR4fadD. Se indica el nombre del gen junto con una breve descripción de éste y el valor de M obtenido de los microarrays en orden decreciente.

Gen	Descripción	Valor de M
<i>sma1699</i>	Hypothetical protein	-6,03904907
<i>smb20031</i>	Hypothetical protein	-5,30320872
<i>sma2295</i>	Probable penicillin binding protein	-4,88316697
<i>smc02231</i>	Hypothetical protein	-4,85059998
<i>smc03896</i>	Putative transcription regulator protein	-4,02280032
<i>sma0943</i>	Putative arylsulfatase	-3,99374959
<i>smb20230</i>	Probable smc22-r protein	-3,80713719
<i>sma1682</i>	NapD like protein	-3,74264118
<i>sma2281</i>	Hypothetical protein	-3,70016293
<i>sma1875</i>	Putative reverse transcriptase	-3,6428541
<i>smc02726 (shmR)</i>	Putative iron transport protein	-3,64215952
<i>smb20037 (aroE2)</i>	Putative shikimate 5 dehydrogenase protein	-3,40323139
<i>sma1683</i>	Putative arylsulfatase	-3,39497804
<i>sma1700</i>	Hypothetical protein	-3,38933431
<i>smb20061</i>	Hypothetical protein	-3,36967702

<i>smb21045</i>	Putative reverse transcriptase maturase protein	-3,2816769
<i>smc01517</i>	Conserved hypothetical protein	-3,22526335
<i>smb20122</i>	Hypothetical protein	-3,14122795
<i>smb21269</i>	Putative ATP binding component of an ABC transporter with an unusual central domain protein	-3,09903441
<i>smb21477</i>	Putative reverse transcriptase maturase protein	-2,99610079
<i>sma0690</i>	Conserved hypothetical protein	-2,78863022
<i>smb20780</i>	Putative reverse transcriptase maturase of intron RmInt1 protein	-2,76273894
<i>smb20484</i>	Putative ABC transporter periplasmic sugar binding protein	-2,74988798
<i>sma1801</i>	Reverse transcriptase maturase	-2,71327996
<i>smb20493</i>	Putative short chain dehydrogenase reductase protein	-2,65056706
<i>sma2263</i>	Hypothetical protein	-2,63736306
<i>smc04336</i>	Hypothetical transmembrane signal peptide protein	-2,60475255
<i>sma0058</i>	Conserved hypothetical protein	-2,57293632
<i>smc03061 (aglE)</i>	Alpha glucosides binding periplasmic ABC transporter protein	-2,47712269
<i>sma0945</i>	Hypothetical protein	-2,47506994
<i>sma0933 (traC)</i>	Probable conjugal transfer protein	-2,32575193
<i>sma2275</i>	Hypothetical protein	-2,29111441
<i>smb20525</i>	Putative transcriptional regulator protein	-2,20455987
<i>smc02316</i>	Hypothetical protein	-2,20130196
<i>smb21225</i>	Putative inositol monophosphatase, possibly involved in PAPS metabolism protein	-2,16690938
<i>smc01630</i>	Putative transcription regulator protein	-2,12561122
<i>sma2337</i>	Putative transmembrane transport protein	-2,06545
<i>sma0616 (fixQ3)</i>	Nitrogen fixation protein	-2,05540205
<i>smb21354 (uxaC)</i>	Putative glucuronate isomerase (uronic isomerase) protein	-2,0519418
<i>smc01518</i>	Conserved hypothetical protein	-2,04506509
<i>smb21334</i>	Hypothetical exported glutamine rich protein	-2,02896854
<i>sma0139</i>	Hypothetical protein	-2,01906372
<i>smc00291</i>	Hypothetical lipoprotein	-1,99962309
<i>smb20489</i>	Putative carbohydrate kinase protein	-1,99026168
<i>smc00264</i>	Putative oxidoreductase protein	-1,96256971
<i>sma2406 (rhdD)</i>	Rhizobactin siderophore biosynthesis protein	-1,96005805
<i>smc01516</i>	Conserved hypothetical protein	-1,95038198
<i>sma2294 (mrcA2)</i>	Probable penicillin binding protein	-1,91196812
<i>smb21224 (nodQ2)</i>	Putative sulfate adenylyltransferase subunit 1 adenylylsulfate kinase protein	-1,90647368



<i>smb21352 (dctQ)</i>	Putative C4 dicarboxylate small membrane transport protein	-1,90466561
<i>smc03026</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,9039122
<i>sma0983</i>	Hypothetical protein	-1,89560501
<i>sma2151</i>	Probable DNA binding protein	-1,88726595
<i>smc01628</i>	Putative periplasmic binding ABC transporter protein	-1,88564821
<i>smb20581</i>	Putative 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase protein	-1,83737887
<i>smc04059</i>	Hypothetical protein	-1,82934564
<i>smb20329 (thuA)</i>	Trehalose catabolism protein	-1,82363689
<i>smc01513 (hmuS)</i>	Putative hemin transport protein	-1,81527741
<i>smc03025 (fliI)</i>	Flagellum specific ATP synthase protein	-1,8014383
<i>smc00265</i>	Putative periplasmic binding protein	-1,75545131
<i>smc01591</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,75204666
<i>smc03121</i>	Putative periplasmic binding ABC transporter protein	-1,74675432
<i>sma1337</i>	Putative sugar ABC transporter, periplasmic solute binding protein	-1,74612688
<i>sma1726</i>	Putative transcriptional regulator	-1,74308523
<i>smc01747</i>	Hypothetical protein	-1,7360922
<i>smb20423</i>	Putative aminotransferase protein	-1,72686287
<i>smb20636</i>	TRm19 putative transposase of insertion sequence ISRm19 protein	-1,71059558
<i>sma2408 (rhbE)</i>	Rhizobactin siderophore biosynthesis protein	-1,70860274
<i>smb20812</i>	Conserved hypothetical protein, possibly membrane anchored	-1,70745947
<i>smc01098</i>	TRm19C cterm fragment of a putative transposase protein	-1,70479553
<i>smb20195 (Ppe)</i>	Putative pentose 5-phosphate-3-epimerase protein	-1,70149293
<i>smc03876</i>	Hypothetical heat shock like protein	-1,67984645
<i>smc02874</i>	Conserved hypothetical protein	-1,67867882
<i>smc01514</i>	Conserved hypothetical protein	-1,65435717
<i>smb20010</i>	Hypothetical protein	-1,65209425
<i>sma0132</i>	Hypothetical protein	-1,64601736
<i>smc01512 (hmut)</i>	Putative hemin binding periplasmic transmembrane protein	-1,64291533
<i>sma2404 (rhbC)</i>	Rhizobactin siderophore biosynthesis protein	-1,63992922
<i>smc00720</i>	Putative 2 component receiver domain protein	-1,63982422
<i>smc00108</i>	Putative acetyltransferase protein	-1,63547152
<i>smb20424</i>	Putative succinate semialdehyde dehydrogenase protein	-1,62639661
<i>smc01394</i>	TRm19N nterm fragment of a putative transposase protein	-1,62108795
<i>smc04168</i>	Conserved hypothetical protein	-1,6034542

<i>smb21132</i>	Putative sulfate uptake ABC transporter permease protein	-1,59333708
<i>sma2410 (rhbF)</i>	Rhizobactin siderophore biosynthesis protein RhsF	-1,58438752
<i>smb21248</i>	Putative aminotransferase protein	-1,58167411
<i>smc02085 (exbB)</i>	Probable biopolymer transport transmembrane protein	-1,57833837
<i>smc04251</i>	Putative mannitol binding periplasmic signal peptide protein	-1,57805348
<i>smb21355</i>	Putative oxidoreductase protein	-1,574892
<i>sma1329</i>	Putative proline dipeptidase	-1,55925762
<i>smc02868</i>	Putative multidrug efflux system protein	-1,54853084
<i>smb21009 (GlpK)</i>	Probable glycerol kinase, similar to sugar kinases protein	-1,53523584
<i>smc03063 (aglG)</i>	Alpha glucosides transport system permease ABC transporter protein	-1,53466636
<i>sma0369</i>	Hypothetical protein	-1,53450536
<i>smb21250</i>	Putative glycosyltransferase protein	-1,53328382
<i>smb21135</i>	Putative amino acid uptake ABC transporter periplasmic solute binding protein precursor	-1,53180128
<i>smb21249</i>	Putative sulfotransferase protein	-1,53024892
<i>sma0620</i>	Hypothetical protein	-1,52349361
<i>smc04338</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,51938117
<i>smc02564</i>	Conserved hypothetical protein	-1,49172449
<i>smb20194</i>	Conserved hypothetical protein	-1,4910634
<i>sma2400 (rhbA)</i>	Diaminobutyrate pyruvate aminotransferase	-1,4891731
<i>smc00954</i>	Conserved hypothetical protein	-1,48282578
<i>smc01489</i>	Hypothetical signal peptide protein	-1,47065075
<i>smc00159</i>	Hypothetical signal peptide protein	-1,47015449
<i>smc02774</i>	Putative ABC transporter periplasmic binding protein	-1,46563658
<i>smc04011 (tacA)</i>	Putative sigma 54 dependent transcription regulator protein	-1,44539409
<i>sma2402 (rhbB)</i>	L-2,4 diaminobutyrate decarboxylase	-1,44446359
<i>smc04396</i>	Putative periplasmic binding protein	-1,4412053
<i>smc02867</i>	Putative multidrug efflux system transmembrane protein	-1,43961096
<i>smc00158</i>	Hypothetical/unknown protein	-1,43936088
<i>smb20162</i>	Putative transcriptional regulator protein	-1,43449957
<i>smc00979</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,43444365
<i>smb20196 (cbbX)</i>	ATPase of the AAA+ class	-1,42471426
<i>smb20931</i>	Putative sugar uptake ABC transporter periplasmic solute binding protein precursor	-1,4231398
<i>smb20032</i>	Hypothetical protein	-1,42300661
<i>smb21315 (expD2)</i>	Putative protein secretion protein, HlyD family membrane fusion protein, secretes ExpE1	-1,42006239

<i>smc04021</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,41866712
<i>smb20777</i>	TRm19 putative transposase of insertion sequence ISRm19 protein	-1,41229878
<i>smc01659</i>	Putative transport transmembrane protein	-1,40522674
<i>smb20443</i>	Putative permease protein	-1,40094849
<i>smb20678 (ttuD2)</i>	Putative hydroxypyruvate reductase protein	-1,39955637
<i>smb21235</i>	Putative formyltransferase, similar to methionyl tRNA(fMet) N formyltransferase protein	-1,38673133
<i>smc02467 (msrA2)</i>	Probable peptide methionine sulfoxide reductase protein	-1,38088768
<i>smc01016</i>	Hypothetical protein	-1,38032206
<i>smb20089</i>	Hypothetical protein	-1,37950016
<i>smc02566 (alkB)</i>	Probable DNA repair system specific for alkylated DNA protein	-1,37665139
<i>smb21345</i>	Putative sugar uptake ABC transporter periplasmic solute binding protein precursor	-1,37026517
<i>sma1057</i>	Conserved hypothetical protein	-1,36702463
<i>smb20620</i>	Putative sugar uptake ABC transporter periplasmic solute binding protein precursor	-1,36262784
<i>sma0387 (hisC3)</i>	Putative 3 histidinol phosphate aminotransferase	-1,36206141
<i>smb21240</i>	Putative MPA1 family protein	-1,36094211
<i>sma0806</i>	Probable SyrB like regulator	-1,35890434
<i>sma2414 (rhtA)</i>	Rhizobactin receptor precursor	-1,35053991
<i>smc02084 (exbD)</i>	Probable biopolymer transport transmembrane protein	-1,34964767
<i>sma1697</i>	Conserved hypothetical protein	-1,34504775
<i>smb20204 (pggA)</i>	Putative pyrroloquinoline quinone synthesis protein A	-1,34433813
<i>smc00032</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,3395899
<i>smc02514</i>	Putative periplasmic binding ABC transporter protein	-1,33021391
<i>smb20330 (thuB)</i>	Probable trehalosemaltose utilization protein	-1,32440878
<i>smc00195 (cgmA)</i>	Cyclic beta-1,2-glucan modification transmembrane protein	-1,32139208
<i>sma0273</i>	Putative ABC transporter, periplasmic solute binding protein	-1,31572936
<i>smb20490 (fucA2)</i>	Putative L-fuculose phosphate aldolase protein	-1,3156546
<i>smc02324</i>	Putative periplasmic binding ABC transporter protein	-1,30356801
<i>smc01627</i>	Putative permease ABC transporter protein	-1,29292159
<i>smb20442</i>	Putative periplasmic solute binding protein	-1,29101105
<i>sma0981 (ntrR2)</i>	Probable transcription regulator	-1,28972534
<i>smb21208</i>	Putative transcriptional regulator, TetR family protein	-1,28564926
<i>sma1784</i>	Hypothetical protein	-1,27568853

<i>smb21085</i>	Hypothetical protein encoded by ORF3 of ISRM14, IS66 family	-1,27369847
<i>smc00261</i>	Putative fatty acid Co-A ligase protein	-1,27205041
<i>smc03064 (aglA)</i>	Probable alpha glucosidase protein	-1,27102434
<i>smb20488</i>	Conserved hypothetical protein	-1,26812985
<i>smc00168 (sinI)</i>	Putative autoinducer synthase protein	-1,26219706
<i>smb21136</i>	Putative amino acid uptake ABC transporter permease protein	-1,255663
<i>smb21402</i>	Hypothetical calcium binding protein	-1,25417671
<i>smc02655</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,25379321
<i>smb21298</i>	Conserved hypothetical protein, possibly exported	-1,2452326
<i>smc01511 (hmuU)</i>	Putative heme transport system permease transmembrane protein	-1,23862629
<i>smc01624</i>	Putative ABC transporter ATP binding protein	-1,23775369
<i>sma1339</i>	Probable ABC transporter, permease protein	-1,23263214
<i>sma1062</i>	Hypothetical protein	-1,23056648
<i>smc00262</i>	Putative 3 ketoacyl coa thiolase protein	-1,22959138
<i>smc00540</i>	Hypothetical protein	-1,22761419
<i>smb20422</i>	Putative oxidoreductase protein	-1,22448828
<i>smb21005</i>	Hypothetical protein	-1,2219301
<i>smc00038</i>	Hypothetical protein	-1,21874402
<i>sma1612</i>	Conserved hypothetical protein	-1,21822245
<i>sma0855 (nodP1)</i>	ATP sulfurylase small subunit	-1,21788463
<i>smc00998</i>	Conserved hypothetical signal peptide protein	-1,21601542
<i>smc03144</i>	Hypothetical protein	-1,21491828
<i>smb21316 (expD1)</i>	Putative ABC transporter protein, fused ATP binding and membrane spanning components, secretes ExpE1	-1,21119273
<i>smb20861</i>	Putative dehydrogenase, oxidoreductase FAD flavoprotein	-1,21071565
<i>sma0017</i>	Hypothetical protein	-1,21054912
<i>smb20079</i>	Putative hemolysin adenylate cyclase protein	-1,20365144
<i>smb20556</i>	Hypothetical protein	-1,19753962
<i>smc00864</i>	Hypothetical/unknown protein	-1,19183041
<i>smc01658</i>	Putative transport protein	-1,19116163
<i>smc02875</i>	Conserved hypothetical protein	-1,19086594
<i>sma0615 (fixO3)</i>	Cytochrome-c oxidase subunit	-1,18224696
<i>sma0059</i>	Putative dehydrogenase	-1,18075853
<i>smb20964</i>	Putative anti oxidant protein, AhpCTSA family	-1,17763754
<i>smb21004</i>	Hypothetical protein	-1,17406528
<i>smb21247</i>	Conserved hypothetical protein, possibly membrane associated	-1,17103197

<i>smb20614</i>	Hypothetical protein	-1,16310548
<i>smc01241</i>	Hypothetical protein	-1,15464476
<i>smb20416</i> ( <i>ugpB</i> )	Probable ABC transporter periplasmic glycerol 3 phosphate binding protein precursor	-1,15459802
<i>sma1081</i>	Hypothetical protein	-1,14929114
<i>smc02484</i>	Putative amino acid efflux transmembrane protein	-1,14516628
<i>smb21133</i>	Putative sulfate uptake ABC transporter periplasmic solute binding protein precursor, similar to Y11244	-1,13672082
<i>smc02872</i>	Putative permease ABC transporter protein	-1,1278331
<i>smb21245</i> ( <i>exoF3</i> )	Putative OMA family outer membrane protein precursor, similar to ExoF	-1,1256658
<i>smb21121</i> ( <i>lvdH</i> )	Putative isovaleryl Co-A dehydrogenase protein	-1,12398542
<i>smc00953</i>	Putative transcription regulator protein	-1,12041538
<i>sma1727</i>	Putative hydrolase	-1,11182576
<i>sma0617</i> ( <i>fixP3</i> )	Cytochrome-c oxidase membrane anchored subunit	-1,10980651
<i>sma1740</i>	Conserved hypothetical protein	-1,10803653
<i>smc03923</i> ( <i>glgC</i> )	Probable glucose-1-phosphate adenylyltransferase (adp glucose synthase)(adp glucose pyrophosphorylase) protein	-1,10632066
<i>smb21314</i> ( <i>expE1</i> )	Putative secreted calcium binding protein	-1,10304426
<i>sma2273</i>	Hypothetical protein	-1,10265267
<i>smc04341</i>	Putative amino acid binding periplasmic protein	-1,10060038
<i>smc04225</i>	Hypothetical protein	-1,09682989
<i>smc00506</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,09538621
<i>smc01552</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,09479363
<i>smb20816</i>	Putative exported protein, slightly similar to protein involved in assembly of outer membrane proteins	-1,09136995
<i>smb20530</i>	Hypothetical protein	-1,08653912
<i>smc03201</i> ( <i>bkdAa</i> )	Probable 2-oxoisovalerate dehydrogenase alpha subunit protein	-1,08047258
<i>smc03065</i> ( <i>aglK</i> )	Alpha glucosides transport ATP binding ABC transporter protein	-1,07648867
<i>smb20066</i>	Hypothetical protein	-1,06942167
<i>smb21223</i> ( <i>nodP2</i> )	Putative sulfate adenylyltransferase subunit 2 protein	-1,06796913
<i>smb20455</i>	Putative transcriptional regulator protein	-1,06644908
<i>smc02773</i>	Putative ABC transporter ATP binding protein	-1,0646337
<i>smb20319</i>	Conserved hypothetical protein	-1,06377611
<i>sma2261</i>	Hypothetical protein	-1,06303817
<i>sma1610</i>	Conserved hypothetical protein	-1,05694756
<i>smc04053</i>	Hypothetical protein	-1,05432379

<i>smc00637</i>	Putative phosphosugar isomerase protein	-1,05360179
<i>smc02486</i>	Putative oxidoreductase protein	-1,05070021
<i>smb20197 (cbbS)</i>	Putative ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase small subunit protein	-1,0505421
<i>sma1741</i>	Putative iron uptake ABC transporter, ATP binding protein	-1,04911376
<i>smc03150</i>	Putative transcription regulator protein	-1,04451188
<i>smc00922</i>	Putative transporter transmembrane protein	-1,04018404
<i>smc03102</i>	Putative carbon monoxide dehydrogenase large subunit transmembrane protein	-1,03930573
<i>smb20199 (cbbA)</i>	putative fructose 1,6 bisphosphate aldolase protein	-1,03870866
<i>smc01629 (eryD)</i>	Putative <i>ery</i> operon repressor transcription regulator protein	-1,03385694
<i>sma1688</i>	Putative two component response regulator	-1,0338346
<i>sma0809</i>	Hypothetical protein	-1,03297965
<i>smb20750</i>	Putative dehydrogenase, possibly gluconate-5-dehydrogenase protein	-1,03073436
<i>smb20962 (thiD)</i>	Probable phosphomethylpyrimidine kinase protein	-1,03063483
<i>smc03161</i>	Putative oxidoreductase protein	-1,02856026
<i>smc01053 (cysG)</i>	Probable siroheme synthase protein	-1,02592176
<i>sma1438</i>	Putative ABC transporter, periplasmic solute binding protein	-1,02471776
<i>smc02862</i>	Pit accessory protein	-1,02352015
<i>smc00711 (tyrC)</i>	Putative cyclohexadienyl dehydrogenase and <i>adh</i> prephenate dehydrogenase protein	-1,01172596
<i>smb21348</i>	Putative 2-deoxy-D-gluconate-3-dehydrogenase protein	-1,01090997
<i>smc01441 (hflK)</i>	Putative membrane bound protease protein	-1,0087542
<i>smc02487 (lpdA2)</i>	Probable dihydrolipoamide dehydrogenase (e3 component of 2 oxoglutarate dehydrogenase complex) transmembrane protein	-1,00239655
<i>smc01842</i>	Putative methyltransferase transcription regulator protein	-1,00203074

## **CAPÍTULO III**





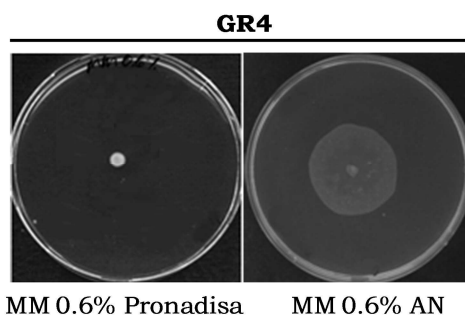
### **3. Caracterización de la movilidad mostrada por las cepas GR4 y Rm1021 de *S. meliloti* en dos nuevas condiciones inductoras de movilidad en superficie: agar noble y 2-tridecanona (2-TDC), e identificación de posibles mecanismos implicados.**

#### **3.1 Agar noble como inductor de movilidad en superficie**

Entre los investigadores que requieren hacer ensayos de movilidad en superficie con bacterias que presentan un *swarming* moderado, es bien conocida la gran variabilidad que muestran estos experimentos. Aunque se intenta controlar al máximo los distintos factores que pueden influir en el grado de humectación de la placa (fuente de agar, cantidad de medio y su temperatura en el momento de verter en las cajas Petri, tiempo de secado o incluso la posición de las cajas en la cabina de flujo laminar durante el periodo de secado), la variabilidad es inherente a este tipo de experimentos (Tremblay and Deziel, 2008). Tal y como ya se ha comentado en Introducción y en anteriores Capítulos, la movilidad *swarming* se puso de manifiesto por primera vez en *S. meliloti* asociada a un mutante *fadD* de la cepa GR4. El medio que permitió observar este tipo de translocación en superficie fue MM conteniendo agar purificado Pronadisa 0.6% (Soto et al. 2002). Ya en aquel primer trabajo se constató la gran importancia de la fuente del agente gelificante puesto que la sustitución del agar purificado por agar bacteriológico anulaba la translocación en superficie del mutante *fadD*. Posteriormente, utilizando las mismas condiciones inductoras de movilidad *swarming*, se pudo comprobar que las cepas Rm1021 y Rm2011 (muy parecida a Rm1021) podían desplazarse en la superficie de este medio con cierta frecuencia, si bien una mutación *fadD* incrementaba dicha movilidad (Nogales et al. 2010). A diferencia de Rm1021/Rm2011, la cepa silvestre GR4 nunca mostró desplazamiento en superficie de MM semisólido.

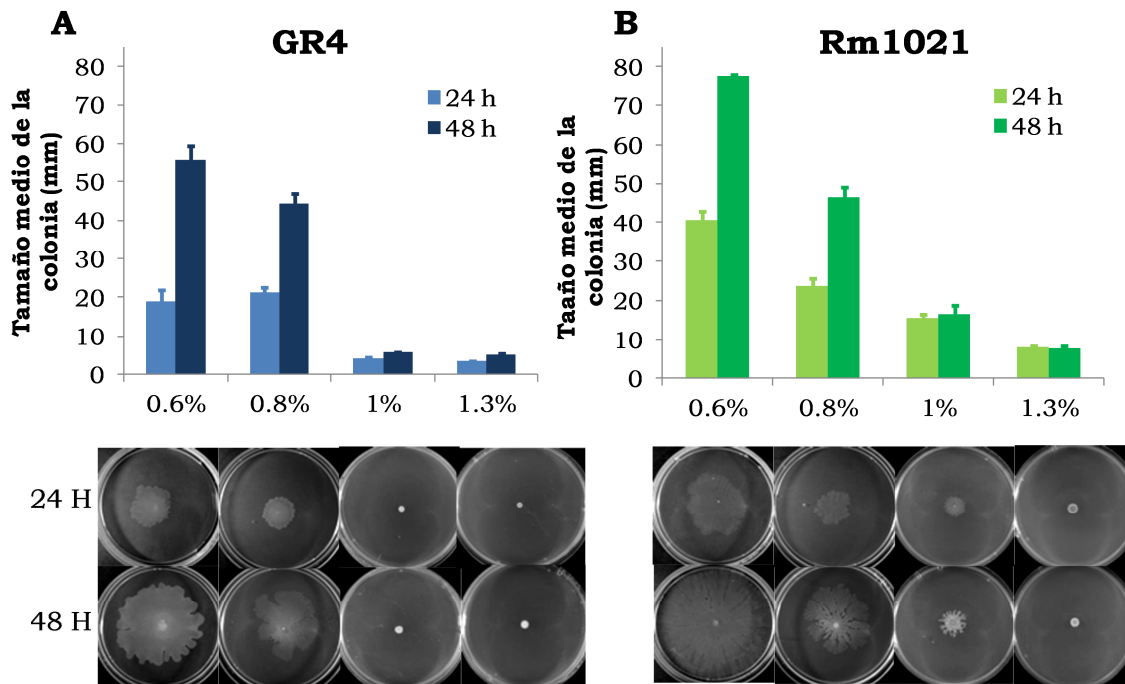
A finales de 2011, coincidiendo con la compra de un nuevo lote de agar purificado Pronadisa, y a pesar de seguir utilizando las mismas condiciones experimentales, dejamos de ser capaces de poner de manifiesto la movilidad en superficie en cepas como mutantes *fadD* que siempre habían mostrado gran capacidad de translocación. Aunque intentamos averiguar si existió alguna diferencia en el proceso de fabricación del agar purificado, no conseguimos obtener ninguna información. A partir de ese momento, se

iniciaron ensayos de movilidad en superficie usando distintos tipos y concentraciones de agentes gelificantes: agar purificado de las marcas comerciales Pronadisa y Oxoid, agar bacteriológico Cultimed, agar noble Difco (BD), y agarosa (Pronadisa). Tras numerosos ensayos pudimos comprobar que la agarosa y el agar noble (Difco) permitían observar con bastante reproducibilidad, desplazamiento en superficie de distintas cepas de *S. meliloti*. Interesantemente, ambos conseguían inducir movilidad en la cepa GR4, ligera en el caso de la primera (datos no mostrados) y mucho mayor con el uso del segundo tipo de agar (figura 1), comportamiento que nunca antes se había puesto de manifiesto. Este hecho nos llevó a escoger el agar noble como nuevo agente gelificante para nuestros experimentos.



**Figura 1.** Aspecto macroscópico de la colonia de GR4 tras el ensayo de movilidad en superficie después de 24 horas de incubación a 28°C en MM conteniendo 0.6% de agar Pronadisa (izquierda) o de agar noble (AN) a la derecha.

Como una primera aproximación, se realizaron ensayos de movilidad en superficie de las cepas silvestres GR4 y Rm1021 en los que la única variación al protocolo estándar fue la utilización de distintas concentraciones de agar noble (concentración mínima 0.6% y máxima de 1.3%), e incubaciones más prolongadas en el tiempo (24 y 48 horas) (figura 2). Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto que: i) mientras una concentración de agar noble 1% ya prácticamente abole la translocación en superficie de GR4, Rm1021 sigue presentando aún desplazamiento; ii) en las concentraciones de agar más altas, 1 y 1.3%, parece existir consolidación del movimiento de Rm1021 tras 24 horas de incubación; iii) las condiciones en las que se observa mayor desplazamiento son aquellas en las que se utiliza la concentración más baja de agar 0.6% y mayor tiempo de incubación (48 horas); iv) la utilización de 0.6% de agar permite ver diferencias notables en la capacidad de translocación entre GR4 y Rm1021 tanto a las 24 como a las 48 h de incubación.



**Figura 2.** Expansión media en superficie medida en milímetros, alcanzada por GR4 (A) y Rm1021 (B) en medio mínimo (MM) solidificado con distintas concentraciones de agar noble. Las medidas fueron tomadas a las 24 y 48 horas de incubación en cámara oscura a 28°C. Se muestra media y error típico de al menos 9 medidas obtenidas en tres experimentos independientes. En la zona inferior de la imagen se muestran las fotos representativas de los ensayos.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió caracterizar en profundidad el tipo de movilidad mostrado por las cepas GR4 y Rm1021, así como sus correspondientes mutantes *fadD* en MM conteniendo 0.6% agar noble tras 24 y 48 horas de incubación.

### 3.1.1 Movilidad de GR4 y GR4*fadD* en MM 0.6% agar noble.

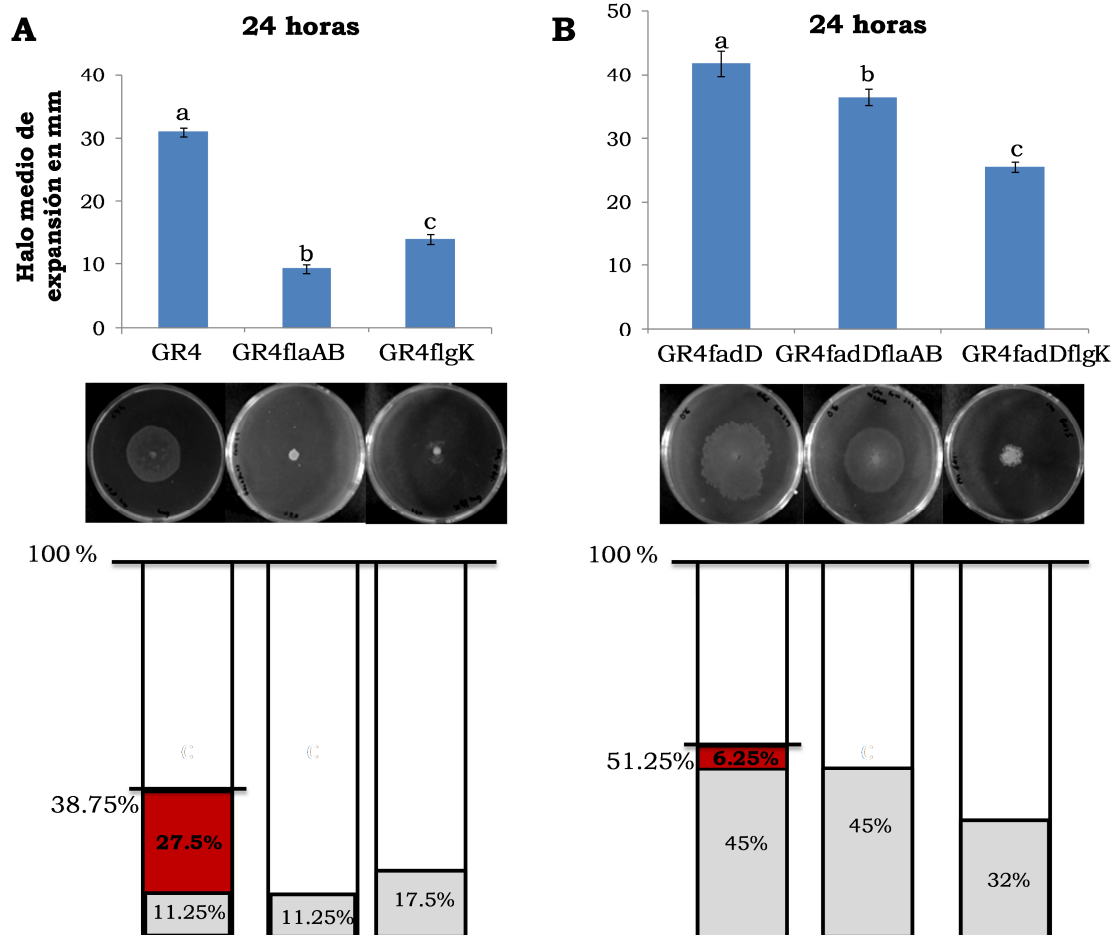
Para poder discernir entre movilidad *swarming*, dependiente de flagelos, u otro tipo de movilidad en superficie independiente de acción flagelar que pudieran presentar en estas condiciones las cepas GR4 y GR4*fadD*, incluimos en este estudio derivados aflagelados. Los dos mutantes aflagelados empleados se encuentran afectados en distintas etapas del proceso de síntesis y ensamblaje del flagelo: un mutante *flaAB* incapaz de sintetizar el filamento flagelar por carecer de la flagelina mayoritaria FlaA, y un mutante *flgK* teóricamente afectado en una proteína asociada al gancho flagelar. En la fig. 24 del capítulo 2 se presentan las observaciones realizadas en TEM de las seis cepas empleadas en este estudio: GR4, GR4*flaAB*, GR4*flgK*, GR4*fadD*, GR4*fadDflaAB* GR4*fadDflgK*, y que demuestran la ausencia de flagelos en los derivados *flaAB* y *flgK*, razón por la que estos derivados exhiben un fenotipo *swimming*

negativo (datos no mostrados). En las figuras 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos con las distintas cepas tras 24 y 48 horas de incubación, respectivamente. En cada figura se muestra una gráfica del valor medio de expansión de cada cepa, una foto representativa, así como una barra en la que se representa el porcentaje de expansión de la colonia debido a acción flagelar o a otro tipo de mecanismo independiente de flagelos.

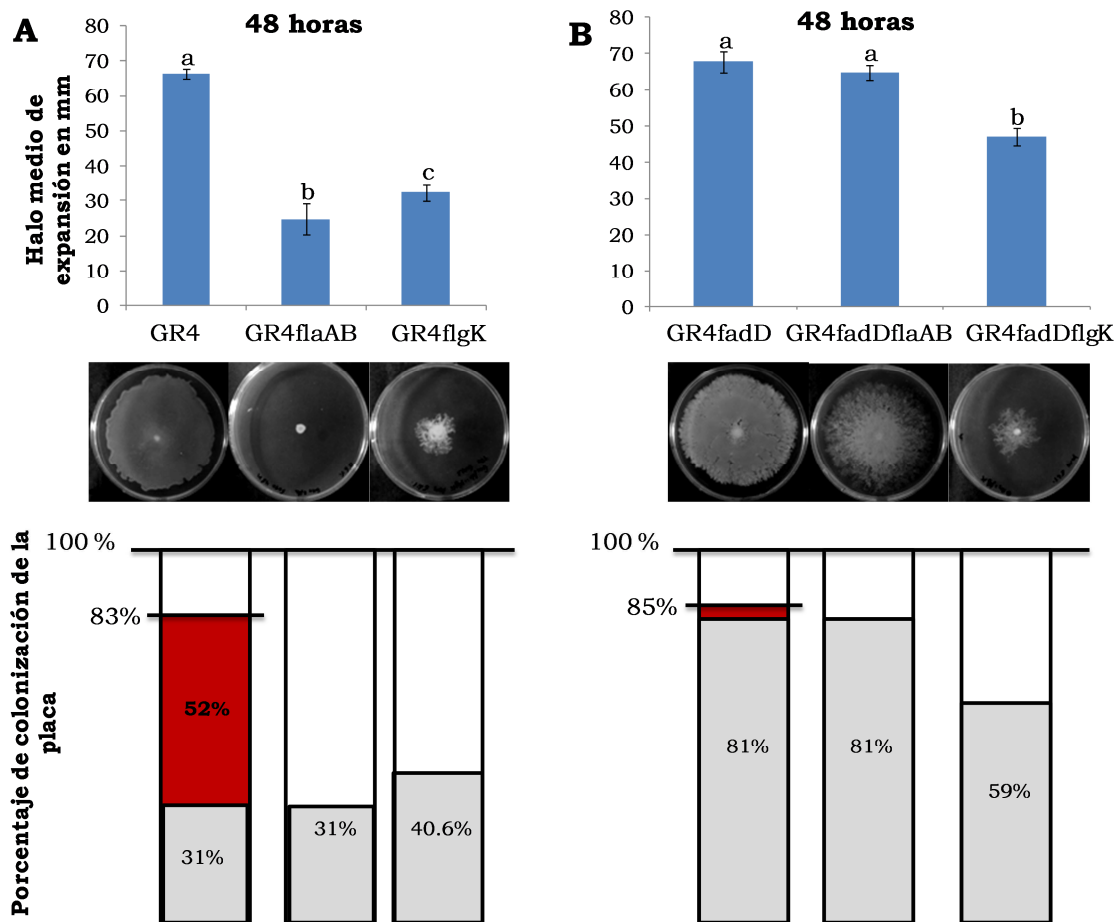
Como se puede observar en la figura 3A y 4A, el movimiento mayoritario desarrollado por GR4 en estas condiciones experimentales es *swarming*, ya que la derivada aflagelada *flaAB* apenas mostró desplazamiento en superficie. Es necesario aclarar, que aunque a lo largo de todo este estudio hemos observado que GR4*flaAB* no se mueve por norma general, sin embargo, con cierta frecuencia (17% de las colonias) pudo observarse desplazamiento en superficie asociado a este mutante. Este hecho que ha sido minoritario, no se muestra en las fotografías representativas, pero sí se ha tenido en cuenta en las gráficas en las que se representa tanto el halo medio de dispersión de la colonia como el porcentaje de colonización de la placa. Curiosamente, el mutante aflagelado GR4*flgK* mostró un comportamiento distinto al observado en GR4*flaAB*, desplazándose en superficie de manera regular en todos los ensayos realizados, si bien lo hacía en menor medida que la cepa silvestre GR4 (figura 3A y 4A). Desconocemos la explicación a este distinto comportamiento en superficie de dos mutantes aflagelados.

En consonancia con la información existente, hemos podido comprobar que en las nuevas condiciones de ensayo de movilidad en superficie, una mutación *fadD* en GR4, favorece la translocación en superficie. Así, después de 24 horas de incubación GR4*fadD* coloniza un 12% más de superficie que la cepa silvestre (figura 3A y 3B). Sin embargo, estas diferencias desaparecen pasadas 48 horas de incubación, ya que ambas cepas llegan a colonizar casi la totalidad de la placa (figura 4A y 4B). El uso de cepas aflageladas nos ha permitido poner de manifiesto que la ausencia de un gen *fadD* funcional en GR4 favorece una movilidad mayoritariamente independiente de flagelos. Tan sólo un 6 ó un 4% del desplazamiento mostrado por la cepa GR4*fadD* a las 24 y 48 horas respectivamente, puede ser atribuido a acción flagelar (figura 3B y 4B). La mutación *fadD* incrementa significativamente la movilidad independiente de flagelos mostrada por los derivados *flaAB* y *flgK*. Sin

embargo, el efecto es mucho más notorio en el caso del mutante *flaAB* que en el mutante *flgK*, diferencias que se mantienen durante todo el experimento y que pueden interpretarse como que la mutación *flgK* interfiere negativamente con el desplazamiento independiente de flagelos promovido por la mutación *fadD*.



**Figura 3.** Movilidad en superficie mostrada por las cepas de *S. meliloti* (A) GR4 y sus derivados aflagelados *flaAB* y *flgK*, y (B) GR4*fadD* y sus correspondientes derivados aflagelados *flaAB* y *flgK*, tras 24 horas de incubación. Se muestran las gráficas indicando el valor medio de expansión de cada cepa (superior), fotos representativas (medio), así como gráficas en las que se representa el porcentaje de colonización de la placa debido a desplazamiento por acción flagelar o a otro tipo de translocación independiente de flagelos (inferior). El porcentaje de colonización de cada cepa se ha estimado teniendo en cuenta el diámetro medio de dispersión de la colonia en relación al diámetro de la placa (8 cm) □ Movimiento en superficie independiente de acción flagelar. ■ Movimiento en superficie dependiente de acción flagelar o *swarming*. □ Porcentaje de placa no colonizada. El porcentaje de colonización debido a acción flagelar se ha calculado como aquél que presenta la cepa flagelada tras sustraer el porcentaje de colonización mostrado por la derivada aflagelada *flaAB*. Los valores proceden de un mínimo de tres experimentos independientes con al menos tres réplicas técnicas. Las barras representan el error típico con un nivel de confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 4.** Movilidad en superficie mostrada por las cepas de *S. meliloti* (A) GR4 y sus derivados aflagelados *flaAB* y *flgK*, y (B) GR4fadD y sus correspondientes derivados aflagelados *flaAB* y *flgK*, tras 48 horas de incubación. Se muestran las gráficas indicando el valor medio de expansión de cada cepa (superior), fotos representativas (medio), así como gráficas en las que se representa el porcentaje de colonización de la placa debido a desplazamiento por acción flagelar o a otro tipo de translocación independiente de flagelos (inferior). El porcentaje de colonización de cada cepa se ha estimado teniendo en cuenta el diámetro medio de dispersión de la colonia en relación al diámetro de la placa (8 cm) □ Movimiento en superficie independiente de acción flagelar. ■ Movimiento en superficie dependiente de acción flagelar o *swarming*. □ Porcentaje de placa no colonizada. El porcentaje de colonización debido a acción flagelar se ha calculado como aquél que presenta la cepa flagelada tras sustraer el porcentaje de colonización mostrado por la derivada aflagelada *flaAB*. Los valores proceden un un mínimo de tres experimentos independientes con al menos tres réplicas técnicas. Las barras representan el error típico con un nivel de confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

### 3.1.2 Movilidad de Rm1021 y 1021fadD en MM 0.6% agar noble.

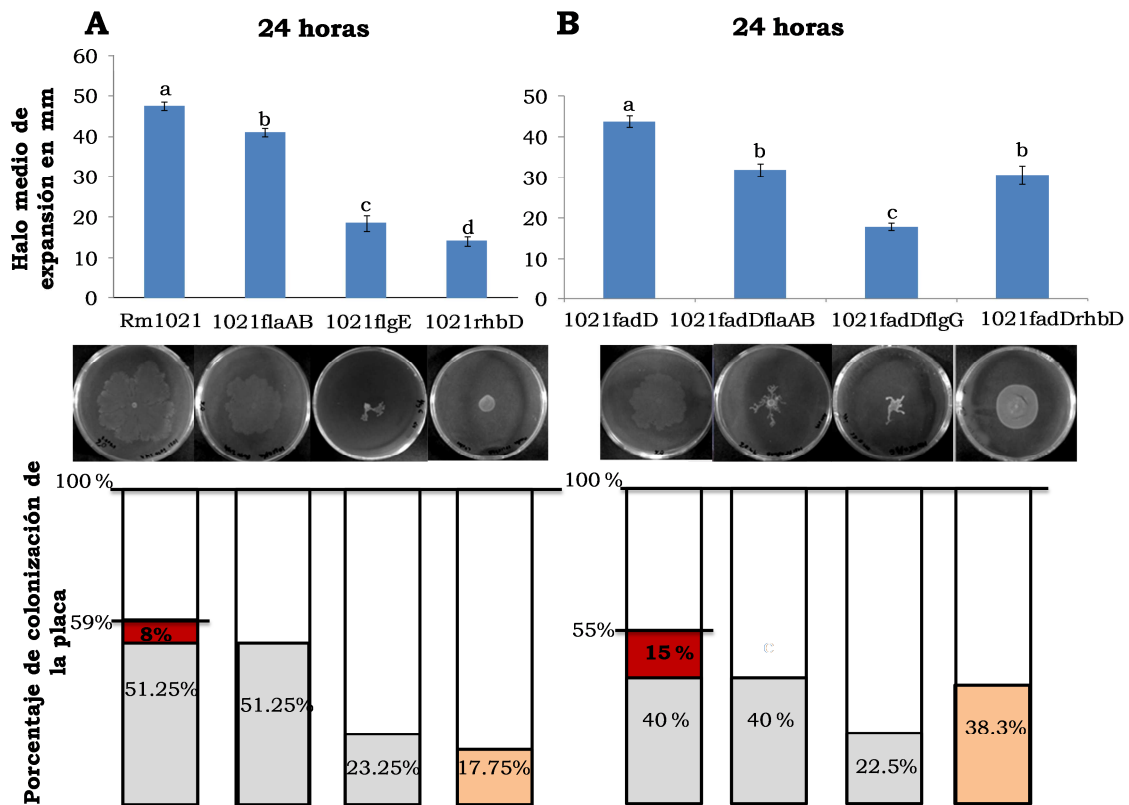
El estudio previo a este trabajo de la movilidad en superficie de Rm1021 utilizando agar Pronadisa puso de manifiesto la existencia en esta cepa de dos tipos de movimiento: uno dependiente de flagelos y otro independiente de acción flagelar, siendo clave en ambos la producción del sideróforo rizobactina 1021 (Rhb1021) (Nogales *et al.*, 2012). Por ello, a la hora de caracterizar el movimiento en superficie mostrado por Rm1021 y su derivado *fadD* se incluyeron cepas aflageladas así como cepas deficientes en la síntesis del sideróforo. Para proceder de igual modo que en GR4 se incluyeron dos tipos de mutantes aflagelados: un derivado *flaAB* incapaz de producir filamento flagelar, y otro mutante afectado en una etapa anterior del ensamblaje del flagelo. En este caso en lugar de utilizar mutantes *flgK* como en GR4, se empleó o bien el mutante 1021flgE (bloqueado a nivel del gancho flagelar, aflagelado y *swimming* negativo (datos no mostrados, Bahlawane *et al.*, 2008), o 1021fadDflgG (transposante NS26, afectado en eje del cuerpo basal, aflagelado y *swimming* negativo tal y como se describe en el Capítulo 1). Como mutantes deficientes en Rhb1021 se han incluido los siguientes mutantes *rhbD*: 1021rhbD (Amaya-Gómez, 2013) y 1021fadDrhbD (obtenido en este trabajo y descrito en el apartado de Anexos A3.1). Los resultados obtenidos con estas cepas en los ensayos de movilidad en superficie se muestran en las figuras 5 y 6.

A diferencia de GR4, la cepa Rm1021 se desplaza en superficie utilizando mayoritariamente un tipo de translocación que es independiente de acción flagelar como muestra el hecho de que el derivado *flaAB* sólo presente una ligera reducción en el diámetro medio de dispersión tras 24 horas de incubación (figura 5A), diferencias que desaparecen transcurridas 48 horas (figura 6A). Al igual que se observó en el fondo genético de GR4, encontramos un distinto comportamiento en superficie de cepas aflageladas derivadas de Rm1021 dependiendo de que tengan o no un HBB (*Hook Basal Body*) completo (figuras 5A y 6A). Este hecho podría indicar la existencia de factores que, teniendo una función en desplazamiento en superficie de *S. meliloti*, se regulan de manera coordinada con el estado de ensamblaje del flagelo. No obstante, el comportamiento de los aflagelados derivados de Rm1021 es el opuesto al observado en GR4, observándose mayor desplazamiento para 1021flaAB que para el mutante 1021flgE que apenas muestra translocación en superficie a lo largo del tiempo.

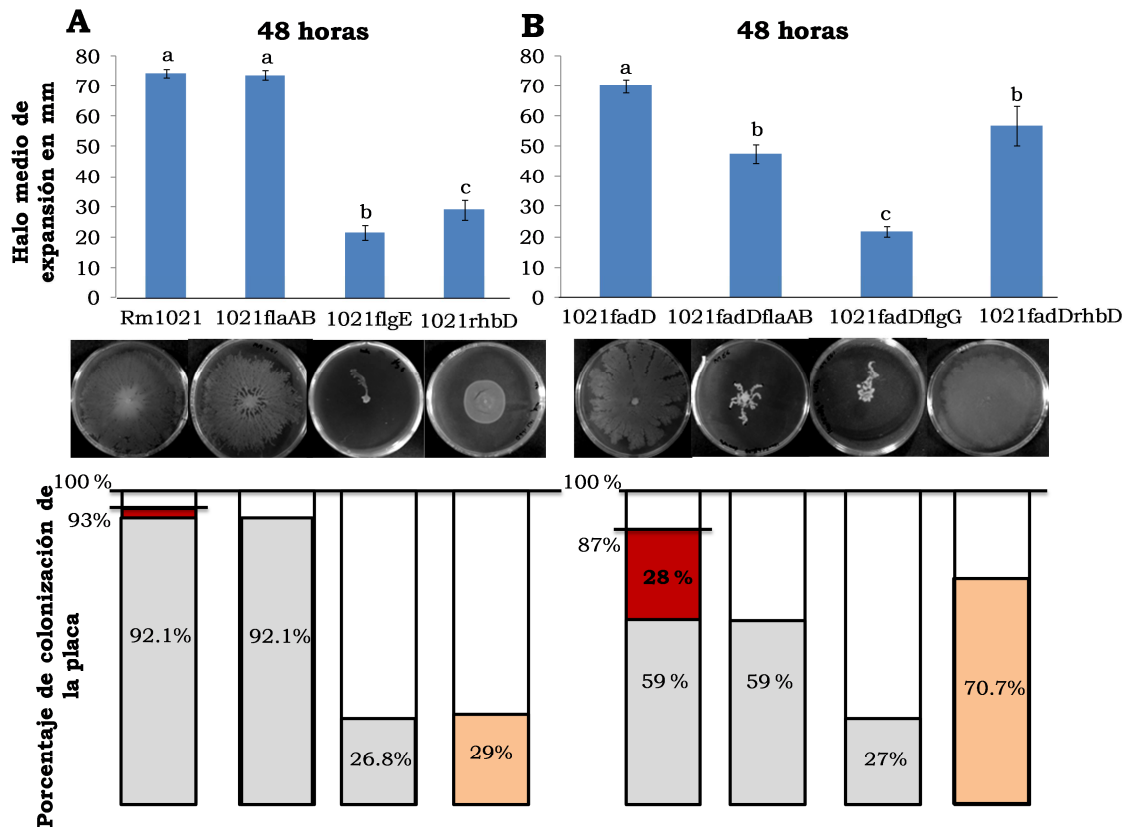
Por otro lado, el fenotipo mostrado por el mutante 1021rhdB indica que el movimiento en superficie de Rm1021 es altamente dependiente de la producción del sideróforo Rhd1021, confirmando resultados previamente obtenidos en agar Pronadisa (Nogales et al. 2010, 2012). No obstante, en las nuevas condiciones de ensayo, la ausencia de Rhd1021 no conlleva inmovilidad total en superficie como ocurría al utilizar agar Pronadisa. El mutante *rhdB* muestra una capacidad de desplazamiento en superficie que es aproximadamente un tercio de la mostrada por la cepa silvestre Rm1021 tanto a las 24 como a las 48 horas. No hemos investigado si dicho movimiento es dependiente o no de acción flagelar.

Contrastando con lo hasta ahora publicado, los resultados obtenidos en este estudio claramente demuestran que la ausencia de un *fadD* funcional en Rm1021 no estimula la translocación bacteriana en superficie (figura 5B y 6B). Sorprendentemente, la mutación *fadD* interfiere negativamente con el movimiento independiente de flagelos mostrado por la cepa 1021flaAB (efecto contrario al observado en GR4), efecto especialmente notable después de 48 horas de incubación. Por tanto, la similitud en el desplazamiento mostrado por Rm1021 y 1021fadD sólo puede ser explicado por un incremento en el movimiento dependiente de acción flagelar o *swarming* causado por la mutación *fadD*. Así, la movilidad *swarming* constituye más de un 27% de la translocación mostrada por 1021fadD tras 48 horas de incubación. Por otro lado, los resultados mostrados en las figuras 5 y 6 revelan que el patrón de movilidad mostrado por 1021fadDflgG es similar al presentado por 1021flgE, resultados que podrían confirmar que la mutación *fadD* no genera efectos apreciables en translocación en superficie en ausencia de un HBB completo. Por último, en estos ensayos se confirman los resultados obtenidos en agar Pronadisa que indicaban que una mutación *fadD* elimina el defecto en translocación en superficie mostrado por mutantes *rhdB*, multiplicando aproximadamente por dos la superficie que ahora es colonizada por la cepa defectiva en sideróforo. No obstante, la movilidad del doble mutante fadDrhdB nunca llega a alcanzar los niveles mostrados por la cepa parental 1021fadD.





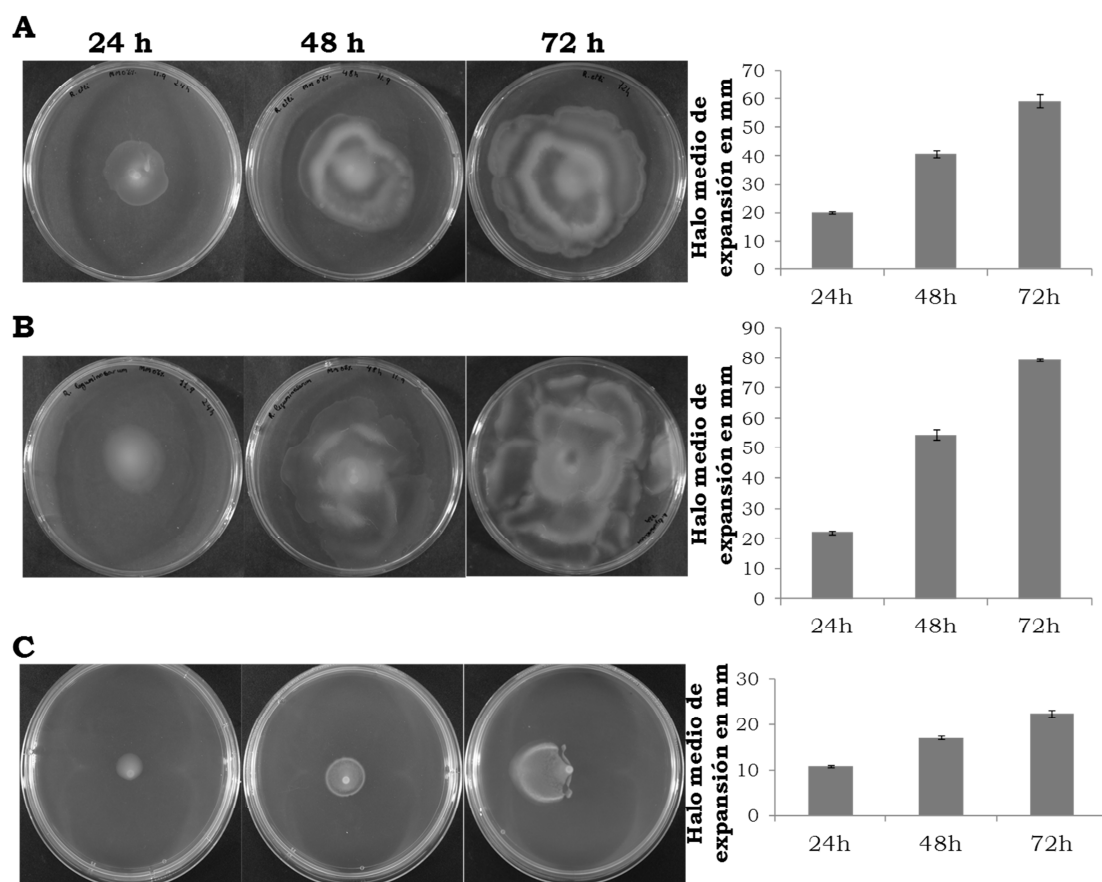
**Figura 5.** Movilidad en superficie mostrada por las cepas de *S. meliloti* (A) Rm1021 y sus derivados aflagelados *flaAB* y *flgE*, y (B) 1021fadD y sus correspondientes derivados aflagelados *flaAB* y *flgG*, así como de sus respectivos mutantes afectados en la síntesis de rizobactina 1021 (*rhbD*), tras 24 horas de incubación. Se muestran las gráficas indicando el valor medio de expansión de cada cepa (superior), fotos representativas (medio), así como gráficas en las que se representa el porcentaje de expansión de la colonia debido a acción flagelar o a otro tipo de translocación independiente de flagelos (inferior). El porcentaje de colonización de cada cepa se ha estimado teniendo en cuenta el diámetro medio de dispersión de la colonia en relación al diámetro de la placa (8 cm) □ Movimiento en superficie independiente de acción flagelar. ■ Movimiento en superficie dependiente de acción flagelar o *swarming*. □ Porcentaje de placa no colonizada. ■ Movimiento en superficie sin caracterizar. El porcentaje de colonización debido a acción flagelar se ha calculado como aquél que presenta la cepa flagelada tras sustraer el porcentaje de colonización mostrado por la derivada aflagelada *flaAB*. Los valores proceden de un mínimo de tres experimentos independientes con al menos tres réplicas técnicas. Las barras representan el error típico con un nivel de confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).



**Figura 6.** Movilidad en superficie mostrada por las cepas de *S. meliloti* (A) Rm1021 y sus derivados aflagelados *flaAB* y *flgE*, y (B) 1021fadD y sus correspondientes derivados aflagelados *flaAB* y *flgG*, así como de sus respectivos mutantes afectados en la síntesis de rizobactina 1021 (*rhbD*), tras 48 horas de incubación. Se muestran las gráficas indicando el valor medio de expansión de cada cepa (superior), fotos representativas (medio), así como gráficas en las que se representa el porcentaje de expansión de la colonia debido a acción flagelar o a otro tipo de translocación independiente de flagelos (inferior). El porcentaje de colonización de cada cepa se ha estimado teniendo en cuenta el diámetro medio de dispersión de la colonia en relación al diámetro de la placa (8 cm) □ Movimiento en superficie independiente de acción flagelar. ■ Movimiento en superficie dependiente de acción flagelar o *swarming*. □ Porcentaje de placa no colonizada. ■ Movimiento en superficie sin caracterizar. El porcentaje de colonización debido a acción flagelar se ha calculado como aquél que presenta la cepa flagelada tras sustraer el porcentaje de colonización mostrado por la derivada aflagelada *flaAB*. Los valores proceden un un mínimo de tres experimentos independientes con al menos tres réplicas técnicas. Las barras representan el error típico con un nivel del confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P < 0.05$ ).

### 3.1.3 Movilidad en superficie de otros Rizobios en MM 0.6% agar noble.

Tal y como se describe en secciones anteriores, el agar noble es un excelente agente gelificante que posee las características necesarias para favorecer la movilidad en distintas cepas de *S. meliloti*. Quisimos conocer si este hecho es extensible a otros rizobios. Para ello realizamos ensayos de movilidad en superficie para *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *S. fredii*, siguiendo el mismo protocolo que el utilizado con *S. meliloti*, tomando medidas a las 24, 48 y 72h de incubación en cámara oscura a 28°C.



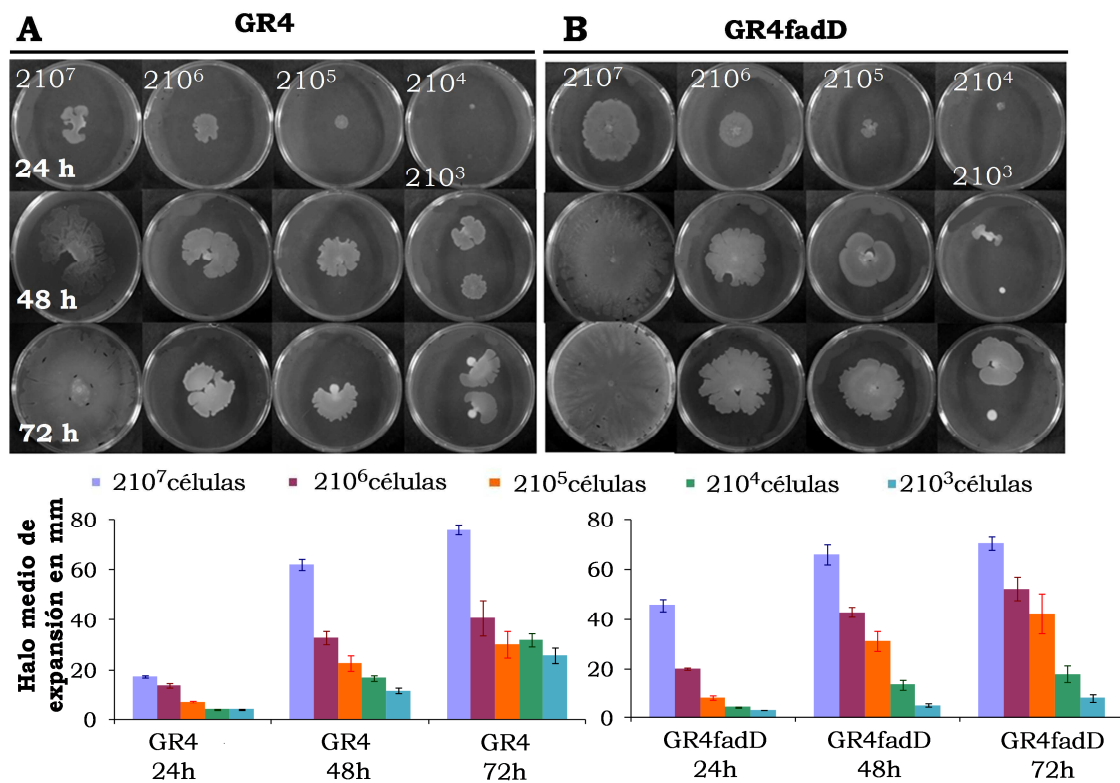
**Figura 7.** Secuencia fotográfica del desplazamiento en superficie mostrado por *R. etli* (A), *R. leguminosarum* (B) y *S. fredii* (C) en MM 0.6% agar noble y a distintos periodos de incubación. A la derecha se muestran las gráficas con los valores medios de expansión tras dos experimentos independientes con al menos 4 réplicas técnicas de cada uno de los distintos rizobios ensayados.

Como se puede observar en la figura 7, bajo estas condiciones experimentales hemos puesto de manifiesto la movilidad en superficie en MM 06% agar noble no sólo de rizobios en los que ya se había descrito movilidad *swarming* (como son *R. etli* y *R. leguminosarum*), sino que también hemos podido comprobar la capacidad de translocación en superficie de *S. fredii*, aunque menos llamativa que en otros rizobios.

### **3.1.4 Efecto de la densidad de inóculo de *S. meliloti* en la aparición de movimiento en superficie en las nuevas condiciones de ensayo**

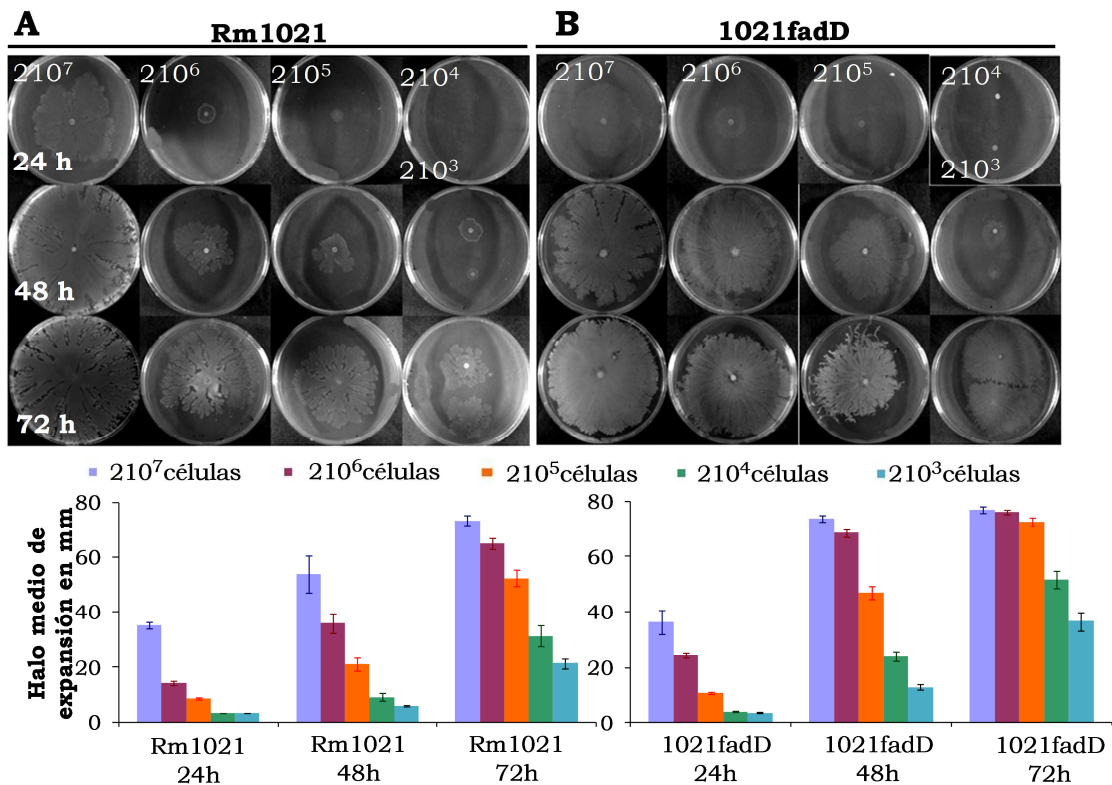
En ensayos de movilidad en superficie realizados con agar Pronadisa, se ha descrito que un mutante *fadD* derivado de GR4 requiere una densidad de inóculo mínima de  $2 \times 10^5$  células para mostrar desplazamiento en superficie. Hemos investigado si en las nuevas condiciones de ensayo las distintas cepas que han mostrado translocación en superficie (cepas silvestres GR4 y Rm1021 y sus derivados *fadD*), también tienen una dependencia de densidad celular. Partiendo de un cultivo que fue tratado como en el ensayo estándar, se hicieron diluciones seriadas para colocar alícuotas de 2  $\mu$ l que contuvieran desde una densidad mínima de  $2 \times 10^3$  células, hasta una máxima de  $2 \times 10^7$  células (densidad de inóculo óptima usada en ensayos de movilidad con agar Pronadisa) (Soto *et al.*, 2002). De cada una de las colonias resultantes se midió el halo de expansión a diferentes periodos de incubación.

De este modo pudimos comprobar que, tanto en GR4 (figura 8A) como en GR4*fadD* (figura 8B), cuanto mayor es la densidad de inóculo inicial, mayor es el desplazamiento observado en las primeras 24 horas de incubación, alcanzándose la máxima translocación con  $2 \times 10^7$  células. Esta densidad es la que más rápido origina la expansión en superficie y de forma más efectiva a las 24, 48 y 72 horas de estudio. En el caso de GR4, incluso partiendo de la densidad de inóculo menor ( $2 \times 10^3$  células), con el transcurso del tiempo de incubación, también se acaba produciendo la expansión en superficie de la colonia. Sin embargo, en el caso de GR4*fadD*, la densidad mínima inicial necesaria para dar lugar a movilidad en superficie fue de  $2 \times 10^4$  células (figura 8B). Cabe destacar que en el caso de GR4, al utilizar inóculos inferiores a  $2 \times 10^7$  células, se observó consolidación en el desplazamiento a las 48 h, hecho no apreciable al utilizar la máxima densidad de inóculo. La mutación *fadD* incrementa la dispersión mostrada por GR4 sólo cuando se utiliza la mayor densidad de inóculo; para densidades de  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^5$  las diferencias se hacen apreciables incrementando el tiempo de incubación, mientras que con densidades de inóculo menores ( $2 \times 10^4$  y  $2 \times 10^3$ ) GR4*fadD* presenta menor translocación en superficie que GR4.



**Figura 8.** Efecto de la densidad de inóculo en el movimiento en superficie mostrado por las cepas (A) GR4 o (B) GR4fadD de *S. meliloti* tras 24, 48 y 72 horas de incubación. Se muestran las correspondientes gráficas representativas de la expansión media alcanzada en los diferentes periodos de incubación por dichas densidades. Los resultados se han obtenido tras la realización de tres experimentos independientes con al menos tres réplicas técnicas de cada uno de ellos.

De forma análoga, tanto en Rm1021 (figura 9A) como en 1021fadD (figura 9B), cuanto mayor es la densidad de inóculo inicial, mayor es el desplazamiento observado en las primeras 24 horas de incubación, alcanzándose la máxima translocación con  $2 \times 10^7$  células. Esta densidad es la que más rápido origina la expansión en superficie y de forma más efectiva a las 24, 48 y 72 horas de estudio. Tanto en Rm1021 como en su derivado *fadD*, incluso partiendo de la densidad de inóculo menor ( $2 \times 10^3$  células), con el transcurso del tiempo de incubación, también se acaba produciendo la expansión en superficie de la colonia. En ambas cepas, todas las densidades de inóculo ensayadas continuaron su expansión durante las 72 horas que duró el estudio. La mutación *fadD* parece incrementar la expansión observada en todas las densidades de inóculo menores a  $2 \times 10^7$  células. Cabe destacar que en 1021fadD, partiendo de densidades de inóculo de  $2 \times 10^6$  y  $2 \times 10^5$  células, tras 72 horas de incubación se alcanza la misma expansión superficial de la colonia que con la densidad de inóculo mayor ( $2 \times 10^7$  células).



**Figura 9.** Efecto de la densidad de inóculo en el movimiento en superficie mostrado por las cepas (A) Rm1021 o (B) 1021fadD de *S. meliloti* tras 24, 48 y 72 horas de incubación. Se muestran las correspondientes gráficas representativas de la expansión media alcanzada en los diferentes periodos de incubación por dichas densidades. Los resultados se han obtenido tras la realización de tres experimentos independientes con al menos tres réplicas técnicas de cada uno de ellos.

### 3.1.5 Influencia de la concentración de hierro en la movilidad en superficie mostrada por distintas cepas de *S. meliloti* en MM 0.6%.AN.

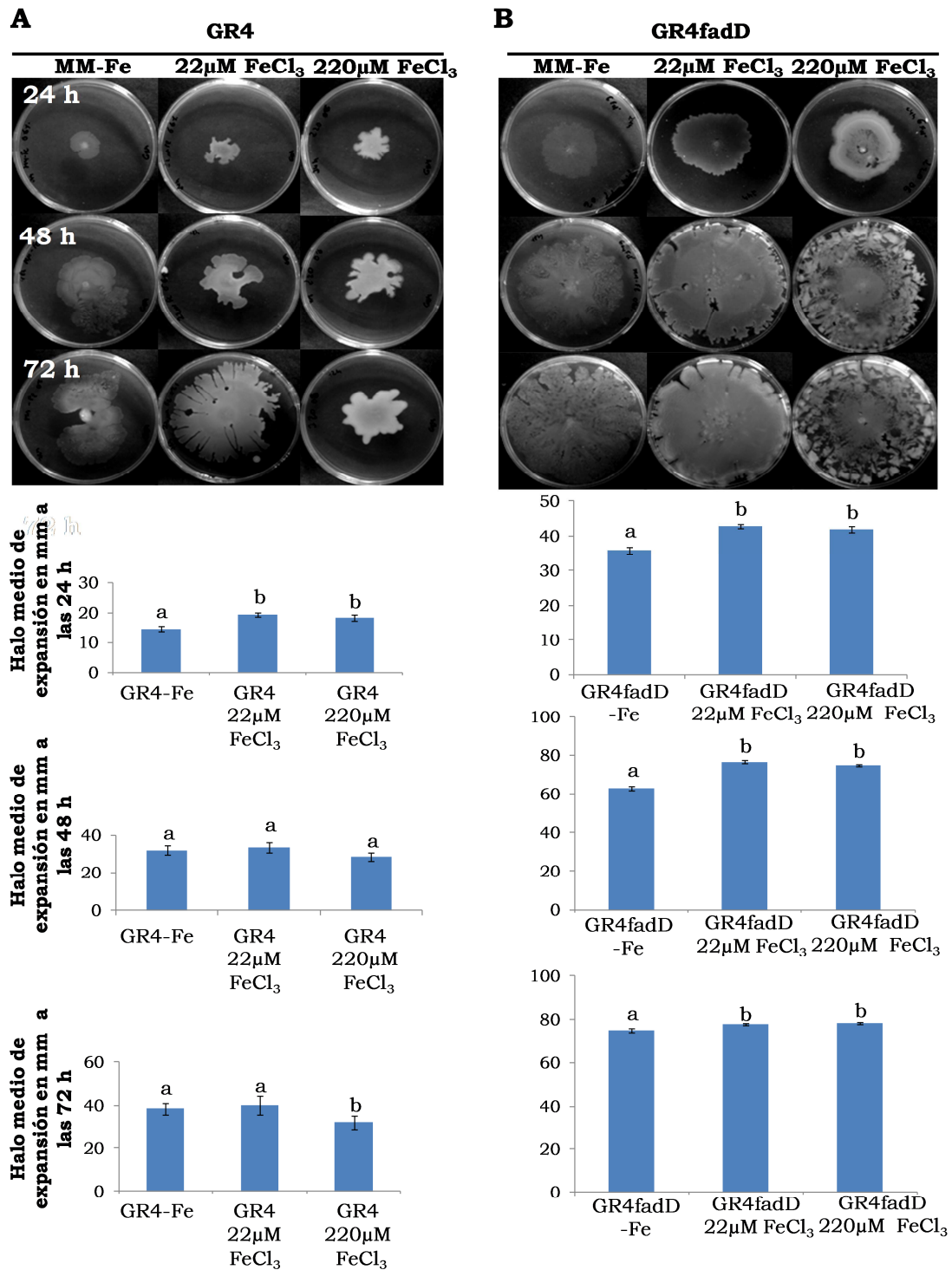
La concentración de hierro presente en el medio es una de las señales extracelulares implicadas en el control del *swarming*. Se ha visto en diversas bacterias productoras de sideróforos como *E. coli*, *P. putida* y *S. meliloti* que la producción de éstos puede ser clave en los procesos asociados a superficie (Inoue *et al.*, 2007; Matilla *et al.*, 2007; Nogales *et al.*, 2010). En *S. meliloti*, se piensa que son las propiedades surfactantes inherentes a Rhb1021 las responsables de favorecer la movilidad en superficie (Amaya-Gómez, 2013; Nogales *et al.*, 2012).

En MM solidificado con agar Pronadisa, la movilidad en superficie de Rm1021 pero no la de mutantes *fadD* se ve inhibida en presencia de alta concentración de hierro (Nogales *et al.*, 2010). Para comprobar si este efecto se sigue

observando utilizando las nuevas condiciones de ensayo de movilidad en superficie, hemos analizado el efecto de la concentración de hierro en el comportamiento de las cepas GR4 y Rm1021, así como sobre sus derivados *fadD*. Los resultados obtenidos se recogen en las figuras 10 y 11. Se han empleado tres concentraciones diferentes de hierro: ausencia de hierro, 22 $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub> (concentración habitual utilizada en nuestros ensayos) y 220 $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub>. La ausencia de hierro sólo provocó ligeras reducciones en la movilidad en superficie mostrada por GR4 y GR4*fadD* (figuras 10A y 10B) que podrían ser consecuencia de una menor tasa de crecimiento en estas condiciones. En Rm1021, la disminución en el desplazamiento en superficie causada por la falta de hierro (figura 11A) fue algo mayor que en el caso de GR4 (fig. 10A), pero donde sin duda alguna la carencia del metal provocó mayores efectos fue en 1021*fadD* (fig.11B), cepa en la que el patrón de desplazamiento se alteró significativamente con una drástica reducción del área colonizada.

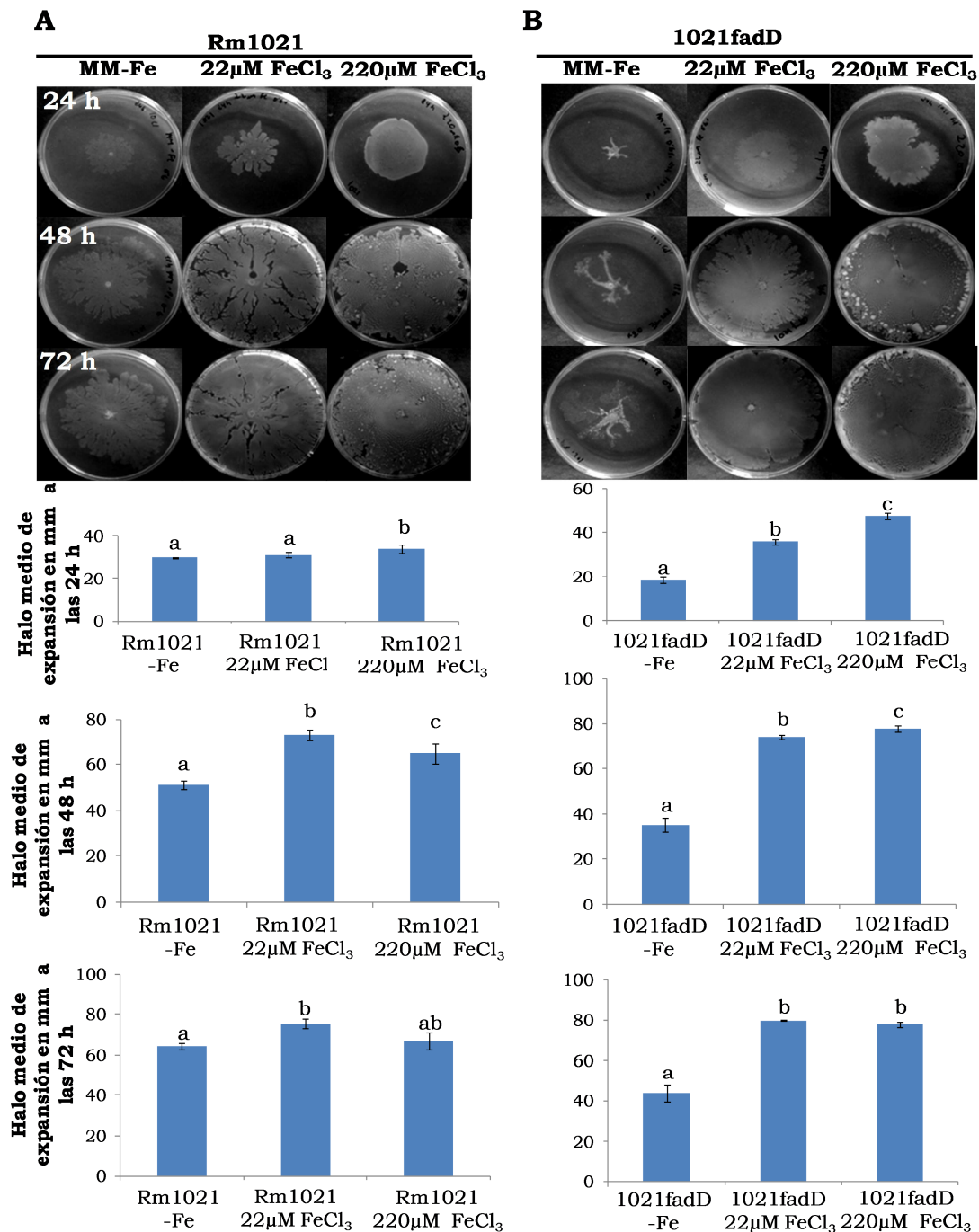
Por otro lado, la presencia de altas concentraciones de hierro (220 $\mu$ M de FeCl<sub>3</sub> inhibe la producción de Rhb1021), reducen pero no bloquean totalmente la movilidad mostrada por GR4 y Rm1021, siendo más notorio el efecto en la primera (figura 10A y 11A). Además hemos comprobado que como ya había sido descrito utilizando agar Pronadisa, altos niveles de hierro no interfieren negativamente en la movilidad en superficie mostrada por mutantes *fadD* de *S. meliloti* (fig. 10B y 11B).





**Figura 10.** Efecto de la concentración de hierro en el desplazamiento en superficie de GR4 (A) y su derivado *fadD* (B) a las 24, 48 y 72h de incubación. En la parte superior se muestran fotos representativas de la movilidad en cada caso, y en la inferior, las gráficas que representan la translocación media en superficie medida en milímetros (mm) de ambas cepas con los distintos tratamientos resultantes de tres experimentos independientes con un mínimo de tres réplicas técnicas. Las barras muestra el error típico con un nivel del confianza del 95%. Letras idénticas indican si existen o no diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

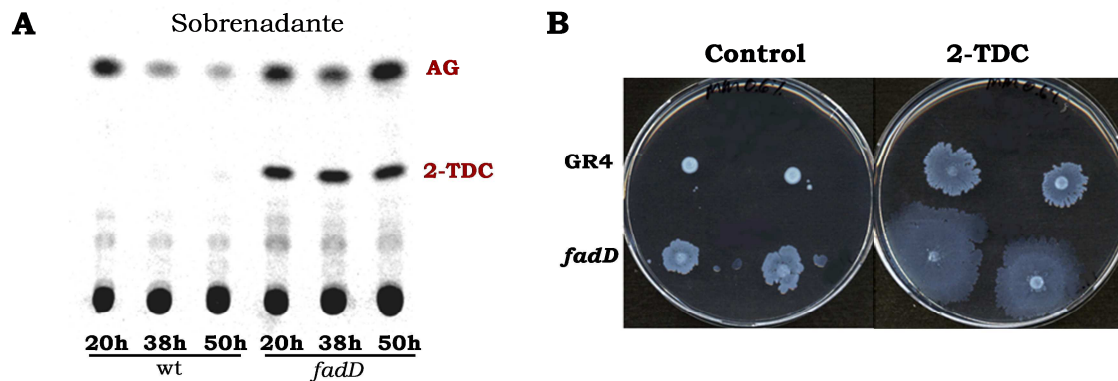




**Figura 11.** Efecto de la concentración de hierro en el desplazamiento en superficie de Rm1021 (A) y su derivado *fadD* (B) a las 24, 48 y 72h de incubación. En la parte superior se muestran fotos representativas de la movilidad en cada caso, y en la inferior, las gráficas que representan la translocación media en superficie medida en milímetros (mm) de ambas cepas con los distintos tratamientos resultantes de tres experimentos independientes con un mínimo de tres réplicas técnicas. Las barras muestra el error típico con un nivel del confianza del 95%. Letras idénticas indican si existen o no diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

### **3.2 Estudio del efecto de la 2-tridecanona (2-TDC) en *S. meliloti*.**

Como ya se ha mencionado, la primera vez que se puso de manifiesto la existencia de *swarming* en un *Rhizobium* fue en un mutante *fadD* de *S. meliloti* afectado en metabolismo lipídico al carecer de la proteína (FadD) encargada del transporte y activación con Coenzima A de ácidos grasos de cadena larga (Soto *et al.*, 2002). Los fenotipos asociados a dicha mutación (*swarming* condicional, alteración de expresión de genes simbióticos y de movilidad, defectos en la capacidad de nodular plantas de alfalfa), y la analogía mostrada con mutantes *rpfB* (homólogo *fadD*) de *Xanthomonas campestris* pv *campestris* incapaces de producir la señal de quorum sensing DSF (*Diffusible Signal Factor*, caracterizado como ác. cis-11-metil-2-dodecenoico) y afectados en virulencia (Barber *et al.*, 1997; He and Zhang, 2008), nos llevó a sugerir la hipótesis de que compuestos de naturaleza lipídica, relacionados con la actividad FadD, podrían actuar como señales capaces de controlar *swarming* y la capacidad simbiótica de la bacteria. Trabajando en esta hipótesis en colaboración con los Dres. López-Lara y Geiger del Centro de Ciencias Genómicas de Cuernavaca (Méjico), permitió obtener dos importantes resultados: i) el mutante *fadD* acumula gran cantidad de ác. grasos (AG) derivados de membrana al entrar en fase estacionaria (figura 12A). Se comprobó que la adición de estos AG en ensayos de movilidad *swarming* no inducían la translocación de la cepa GR4 (Pech-Canul *et al.*, 2011); ii) la identificación de 2-TDC (metil undecil cetona) como compuesto que sólo se acumula en el mutante *fadD* (figura 12A) y que es capaz de inducir motilidad en superficie en *S. meliloti* (figura 12B) (Soto *et al.* En preparación; Patente PCT/ES2013/070570).



**Figura 12.** A) Cromatografía en capa fina (TLC) de extractos lipídicos de cepas wt y mutante *fadD* de *S. meliloti* Rm1021 que permitió la identificación de la 2-tridecanona (2-TDC) como metabolito responsable de la estimulación de la movilidad en superficie en esta bacteria. B) Incremento del movimiento en superficie de cepas de *S. meliloti* tras la adición de 2-TDC (50 $\mu$ M) a placas de MM semisólido (0.6% agar Pronadisa).

A partir de ese momento las investigaciones del grupo se han centrado en estudiar el mecanismo mediante el cual la 2-TDC es capaz de inducir el desplazamiento en superficie de *S. meliloti*, y el papel que puede ejercer esta molécula en la interacción de la bacteria con su planta hospedadora. La información existente sobre los efectos biológicos de la 2-TDC es escasa. Se sabe que la 2-TDC es un compuesto natural volátil (VOC) de larga cadena alifática inicialmente identificado como el compuesto producido por los tricomas de variedades silvestres de tomate, *Solanum habrochaites* subsp. *Glabratum*, y responsable de la alta resistencia de estas plantas al ataque de insectos herbívoros y ácaros (Williams *et al.*, 1980). Posteriormente, diversos estudios han demostrado que la 2-TDC posee actividad insecticida y acaricida (Antonious *et al.*, 2003), y es útil incluso como repelente de garrapatas (Kimps *et al.*, 2011). También se ha identificado esta metilcetona en otras plantas, como por ejemplo, en bulbos de cebolla, asignándole un papel protector frente al ataque de insectos y de arañas (Antonious, 2013).

No sólo se ha encontrado este compuesto relacionado con el mundo vegetal, ya que también se ha identificado en animales y en varios microorganismos, convirtiendo a la 2-TDC en un compuesto ampliamente distribuido en la naturaleza. En abejas obreras, por ejemplo, se ha comprobado la presencia de esta molécula en las glándulas mandibulares de estos insectos y parece ser la responsable de inducir respuestas agresivas relacionadas con la fuente de alimento al actuar como feromona (Schorkopf *et al.*, 2009). En el ciervo *Odocoileus hemionus columbianus*, se ha identificado este compuesto, junto a otras moléculas de estructura similar, como el principal componente secretado

por las glándulas interdigitales probablemente implicado en comunicación semioquímica (Wood *et al.*, 1995). En lo que a microorganismos se refiere, existen estudios que han identificado a la 2-TDC como uno de los VOC producidos por determinados géneros bacterianos de la rizosfera (*Burkholderia*, *Serratia* y *Escherichia*), sugiriendo que podrían funcionar como efectores que inhiben la respuesta defensiva de la planta (Blom *et al.*, 2011).

Para identificar el mecanismo mediante el cual la 2-TDC es capaz de inducir translocación en superficie en cepas de *S. meliloti*, decidimos, por un lado, caracterizar el efecto que esta metilcetona tiene sobre la movilidad en superficie desarrollada por GR4, Rm1021 y derivados *fadD* de éstos y, por otro lado, conocer mediante una aproximación transcriptómica qué cambios a nivel de expresión génica global induce esta sustancia.

### **3.2.1 Efecto de la 2-TDC sobre la movilidad en superficie de *S. meliloti*.**

Previo a este estudio se comprobó que la adición de distintas concentraciones de 2-TDC hasta un máximo de 500  $\mu\text{M}$  no afecta al crecimiento en MM líquido en GR4 ni en Rm1021 de *S. meliloti*. Tampoco se ve afectado al halo de movilidad *swimming* cuando se adiciona al medio 50 ó 500  $\mu\text{M}$  de 2-TDC en ninguna de las cepas anteriormente citadas (datos no mostrados).

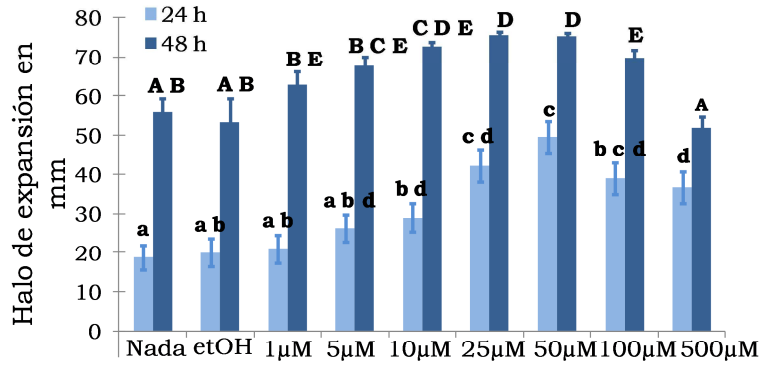
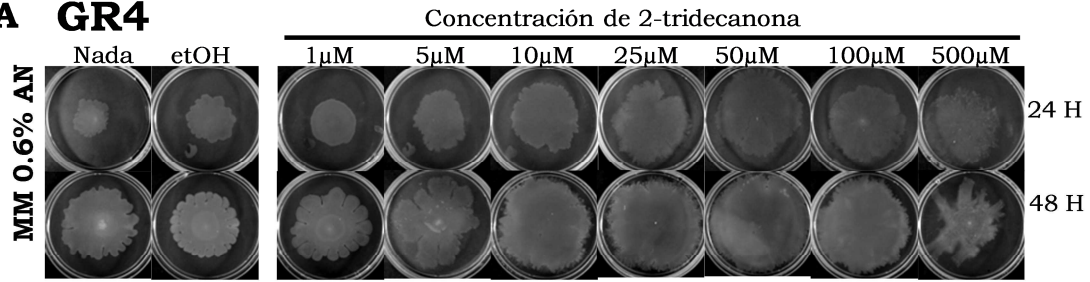
Para determinar la concentración y condiciones óptimas de actuación de esta metilcetona, capaces de inducir la mayor respuesta de movilidad en superficie en GR4 y Rm1021, se realizaron tres ensayos independientes de movilidad en superficie usando varias concentraciones (1, 5, 10, 25, 50, 100 y 500  $\mu\text{M}$ ) de 2-TDC aplicadas como gotas de 20  $\mu\text{l}$  de soluciones stocks 1000x en la tapa de placas que contenían MM solidificado con 0.6, 0.8, 1 ó 1.3% de agar noble. Las placas control contenían 20  $\mu\text{l}$  de etanol, el disolvente empleado para preparar las soluciones de 2-TDC. El resultado obtenido tras 24 y 48 horas de incubación a 28°C se muestra en las fig. 13 y 14.

Como se puede ver en la figura 13, independientemente de la concentración de agar noble usada existe un rango de concentración óptimo comprendido entre 10 y 100  $\mu\text{M}$  de 2-TDC que estimula la movilidad en superficie de GR4, en comparación con las condiciones control. Sólo con la mayor concentración de agar noble (1.3%) no es posible ver este efecto en la cepa GR4, probablemente porque esta concentración ya es demasiado restrictiva para la translocación en

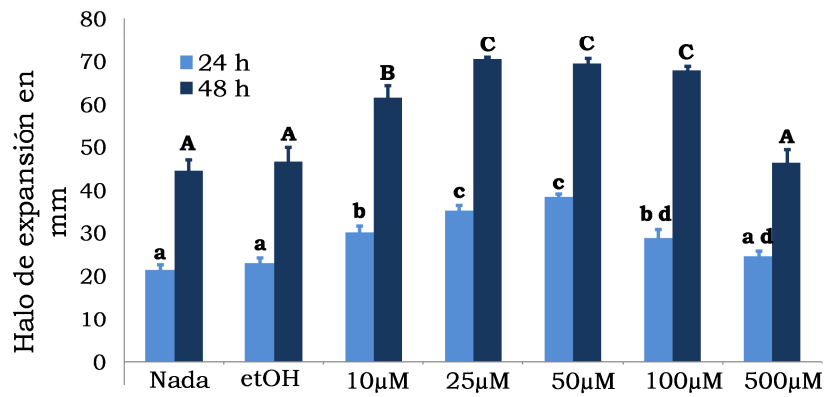
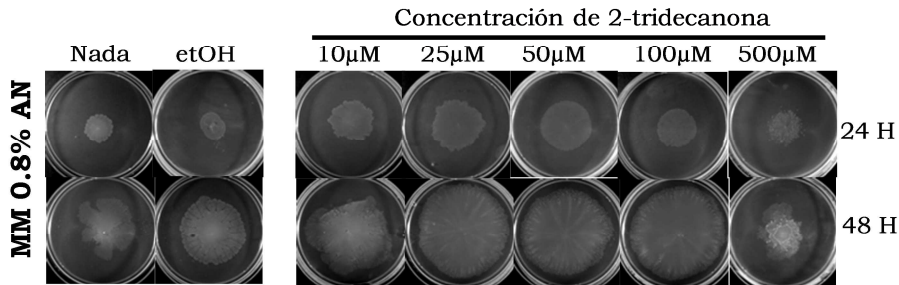
superficie de esta cepa. Comparando los distintos tratamientos, se puede concluir que el mayor efecto que la 2-TDC ejerce sobre la movilidad de GR4 se observa cuando dicha metilcetona se emplea a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  en placas de MM 1% AN, cuadruplicando su halo de expansión con respecto a las placas tratadas únicamente con etanol.

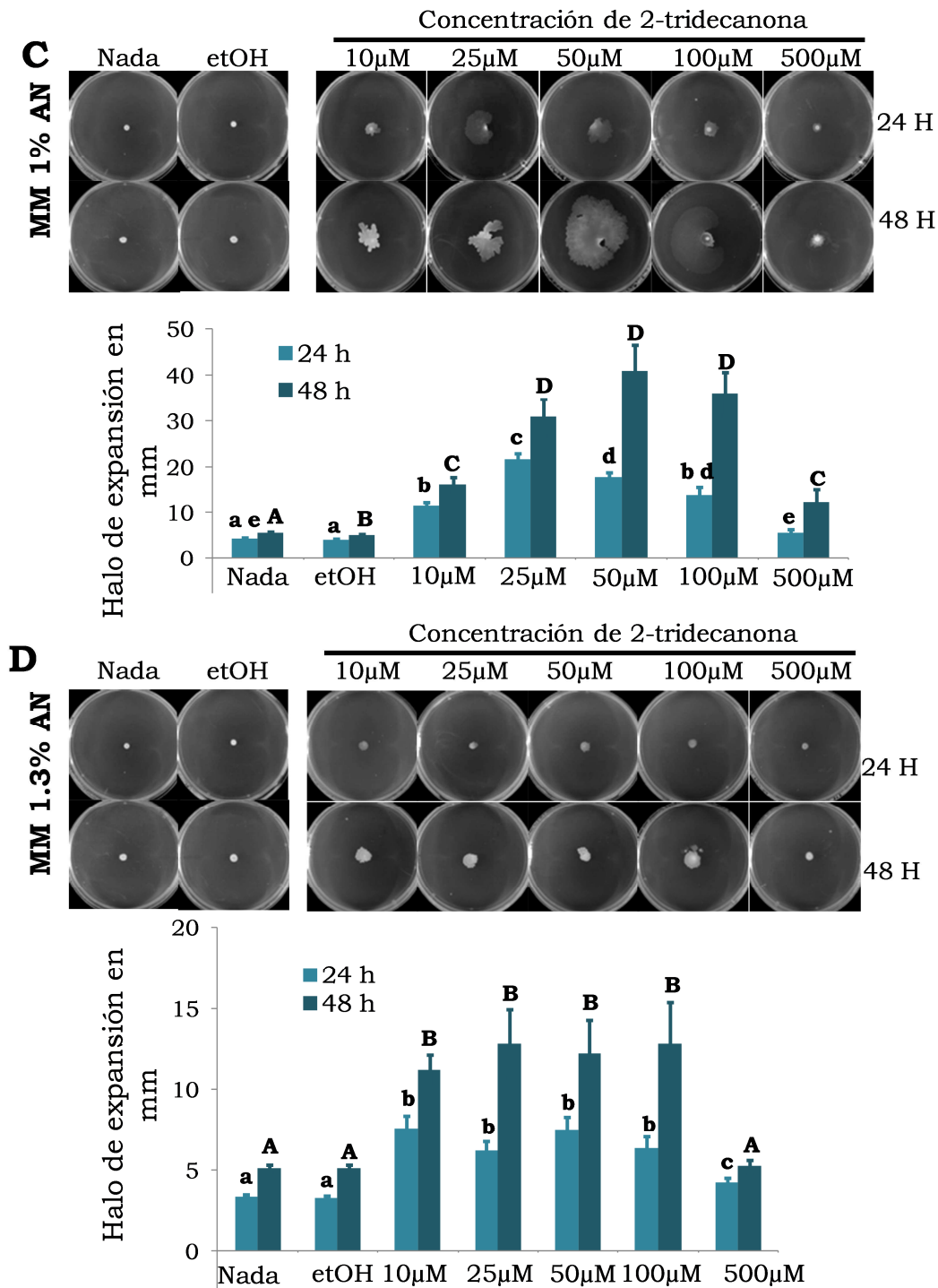
Para Rm1021 (fig. 14), el rango de concentración óptima de 2-TDC que estimula el movimiento en superficie se encuentra entre 10 y 100  $\mu\text{M}$ . En este caso, el efecto estimulador de 2-TDC pudo observarse incluso en medios conteniendo la mayor concentración (1.3%) de agar Noble, mientras que en placas con 0.6% el efecto observado fue el menos significativo, probablemente consecuencia de la gran movilidad en superficie que la cepa Rm1021 presenta en condiciones control. El mayor efecto observado resultó de la combinación de 2-TDC añadida a una concentración de entre 25 a 100  $\mu\text{M}$  sobre placas de MM 1% tras 48 horas de incubación, condiciones que duplican la expansión en superficie mostrada por esta cepa en ausencia de la metilcetona (figura 14).

**A GR4**

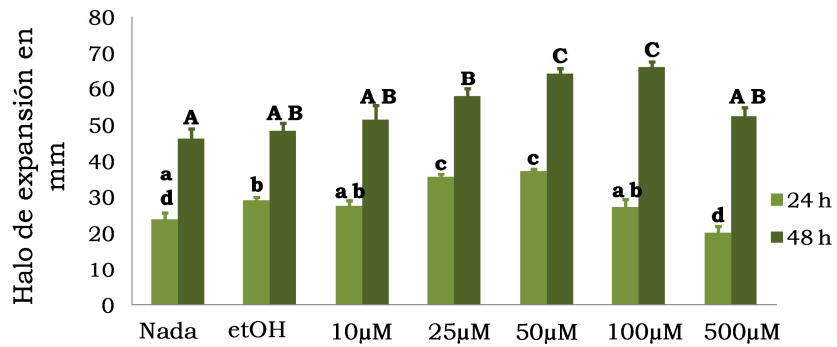
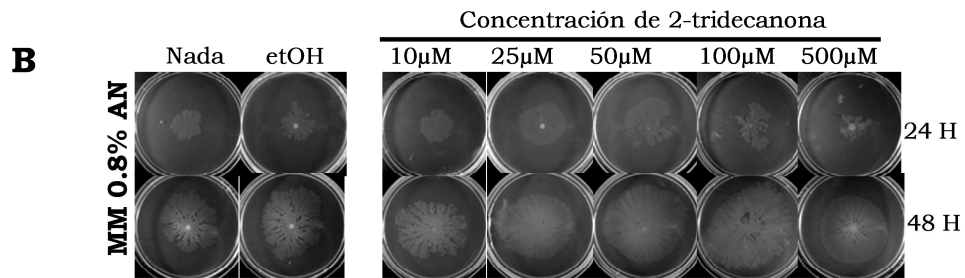
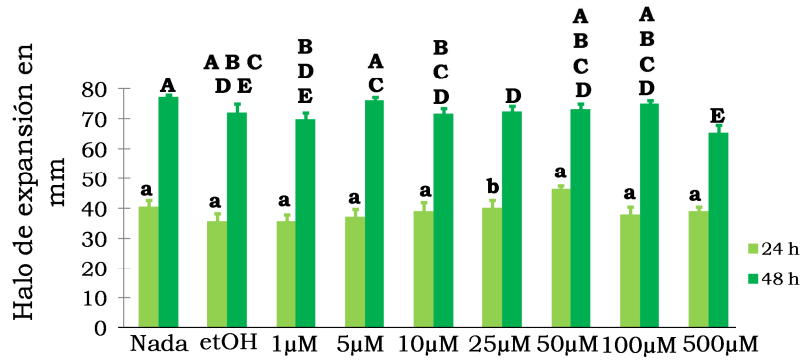
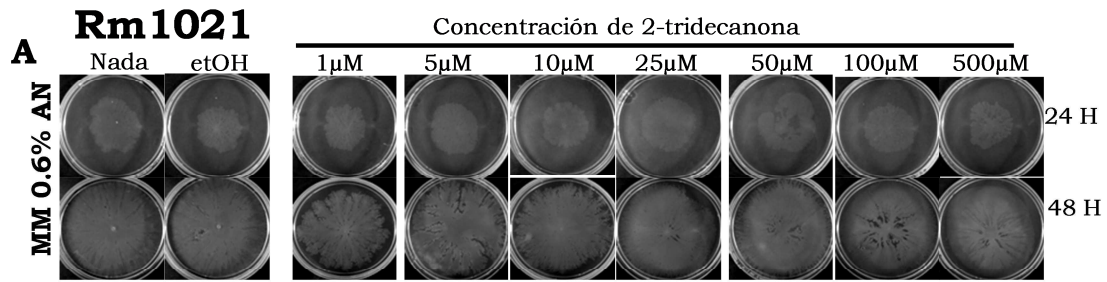


**B**

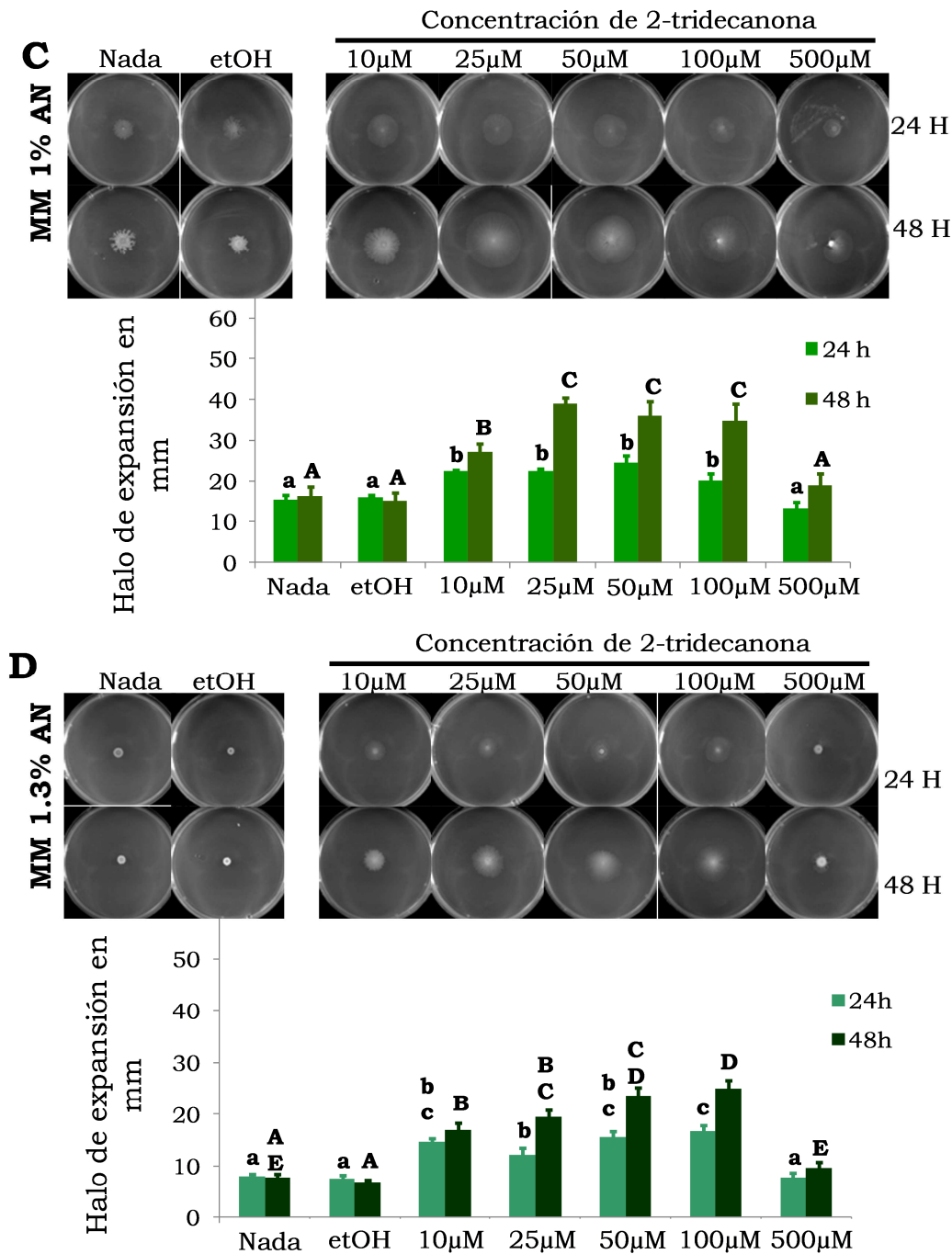




**Figura 13.** Efecto de distintas concentraciones de 2-TDC sobre la movilidad en superficie de la cepa GR4 de *S. meliloti* en MM conteniendo 0.6% (A), 0.8% (B), 1% (C) o 1.3% (D) de agar noble (AN). Se muestran fotos representativas y las gráficas indicando la expansión media en milímetros obtenida de 9 medidas en 3 experimentos independientes, tras 24 y 48 horas de incubación. Las barras representan el error típico con un nivel del confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).





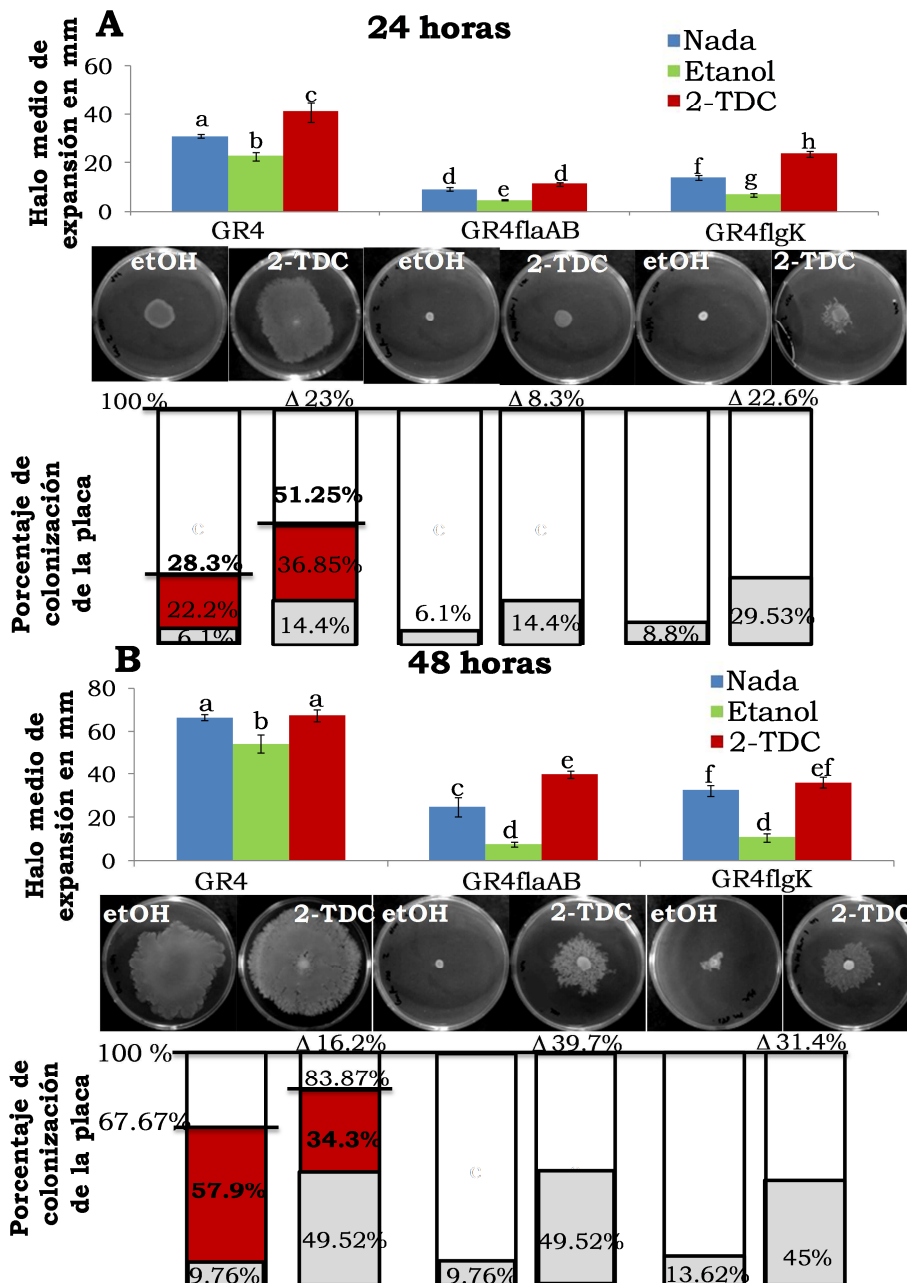


**Figura 14.** Efecto de distintas concentraciones de 2-TDC sobre la movilidad en superficie de la cepa Rm1021 de *S. meliloti* en MM conteniendo 0.6% (A), 0.8% (B), 1% (C) o 1.3% (D) de agar noble (AN). Se muestran fotos representativas y las gráficas indicando la expansión media en milímetros obtenida de 9 medidas en 3 experimentos independientes, tras 24 y 48 horas de incubación. Las barras representan el error típico con un nivel del confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

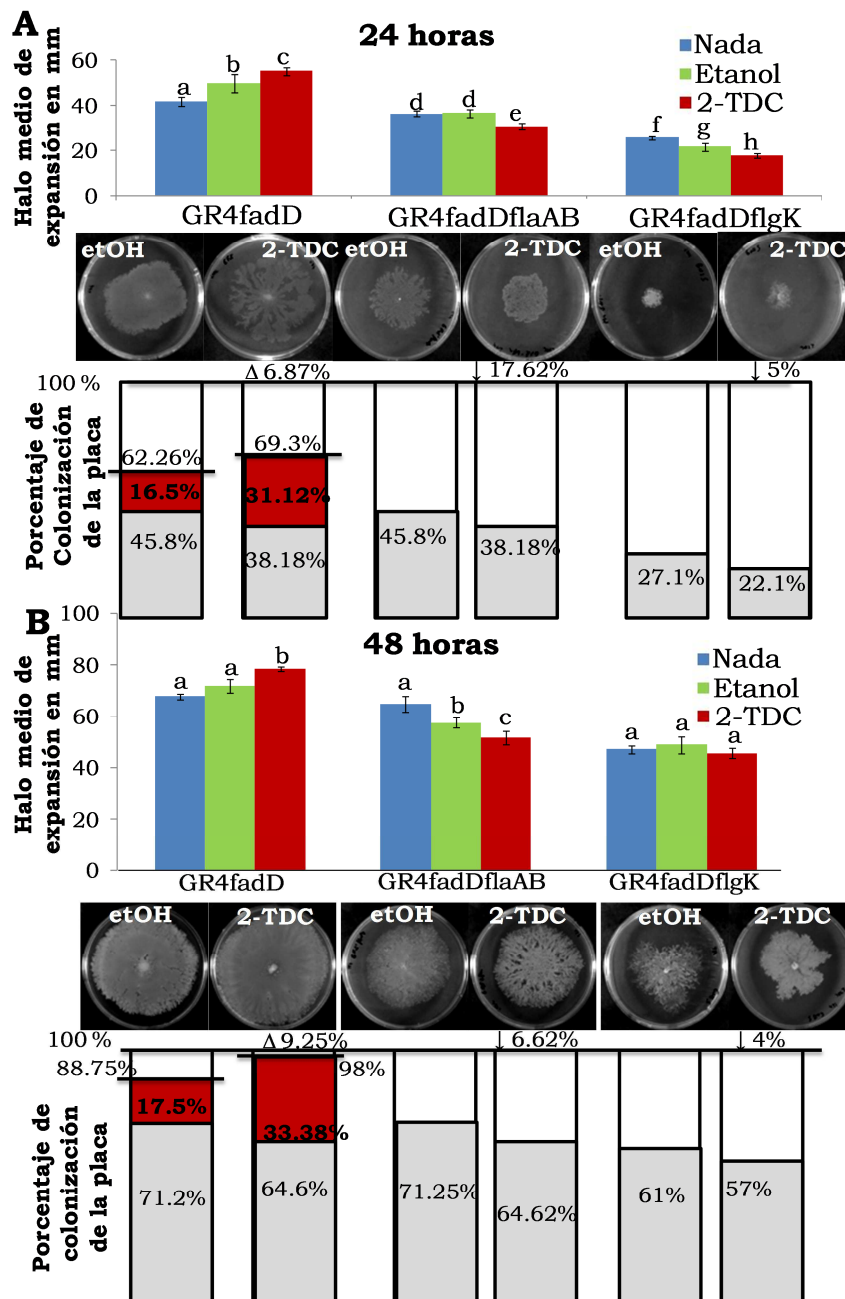
Una vez comprobado el efecto que la 2-TDC ejerce sobre GR4 y Rm1021 decidimos realizar una caracterización en profundidad de la movilidad en superficie de GR4 y su derivado *fadD*, utilizando la concentración óptima de 2-TDC (50  $\mu$ M), y unas condiciones menos restrictivas para la translocación en superficie (MM 0.6%). Cada experimento ha sido ensayado por triplicado y ha constado de un mínimo de tres réplicas. Las medidas de la expansión superficial han sido realizadas a las 24 y 48 horas de incubación.

Para conocer si el tipo de movilidad que promueve esta metilcetona en superficie es o no dependiente de flagelos hemos incluido en el estudio los mutantes afectados en genes flagelares *flaAB* y *flgK* de GR4 y GR4*fadD*.

Tanto a las 24 como a las 48 horas de incubación se observa que la 2-TDC produce una estimulación de la translocación en superficie de GR4 y de sus derivados aflagelados *flaAB* y *flgK*, no detectándose grandes diferencias en el comportamiento entre estos dos últimos (figura 15A y B). El hecho de que el desplazamiento mostrado por GR4 en presencia de 2-TDC sea superior al de sus derivados aflagelados nos permite concluir que en esta bacteria, la 2-TDC estimula tanto el *swarming* como un movimiento independiente de acción flagelar. En el caso de la cepa GR4*fadD* (figura 16), que desarrolla principalmente un movimiento independiente de flagelos, y en las condiciones experimentales utilizadas (0.6% AN), el efecto promotor de la movilidad superficial causado por la adición de 2-TDC es menos significativo que para GR4 (incrementos en translocación inferiores al 10%). En el caso de los derivados aflagelados *flaAB* y *flgK* de GR4*fadD*, la 2-TDC o no tuvo efecto o fue ligeramente negativo por lo que podríamos concluir que la pequeña promoción del desplazamiento en superficie observado para la cepa GR4*fadD* en respuesta a la metilcetona se debe fundamentalmente a la estimulación de *swarming*.



**Figura 15** Movilidad en superficie mostrada por las cepas de *S. meliloti* GR4 y sus derivados aflagelados *flaAB* y *flgK* tras 24 (A) ó 48 (B) horas de incubación con etanol (etOH) o 2-TDC. Se muestran gráficas indicando el valor medio de expansión de cada cepa con los diferentes tratamientos aplicados (superior), fotos representativas (centro), así como gráficas en las que se representa el porcentaje de expansión de la colonia debido a acción flagelar o a otro tipo de translocación independiente de flagelos (inferior) y las El porcentaje de colonización de cada cepa se ha estimado teniendo en cuenta el diámetro medio de dispersión de la colonia en relación al diámetro de la placa (8 cm). □ Movimiento en superficie independiente de acción flagelar. ■ Movimiento en superficie dependiente de acción flagelar o *swarming*. □ Porcentaje de placa no colonizada. El porcentaje de colonización debido a acción flagelar se ha calculado como aquél que presenta la cepa flagelada tras sustraer el porcentaje de colonización mostrado por la derivada aflagelada *flaAB*. Los valores proceden un un mínimo de tres experimentos independientes con al menos tres réplicas técnicas. Las barras representan el error típico con un nivel del confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

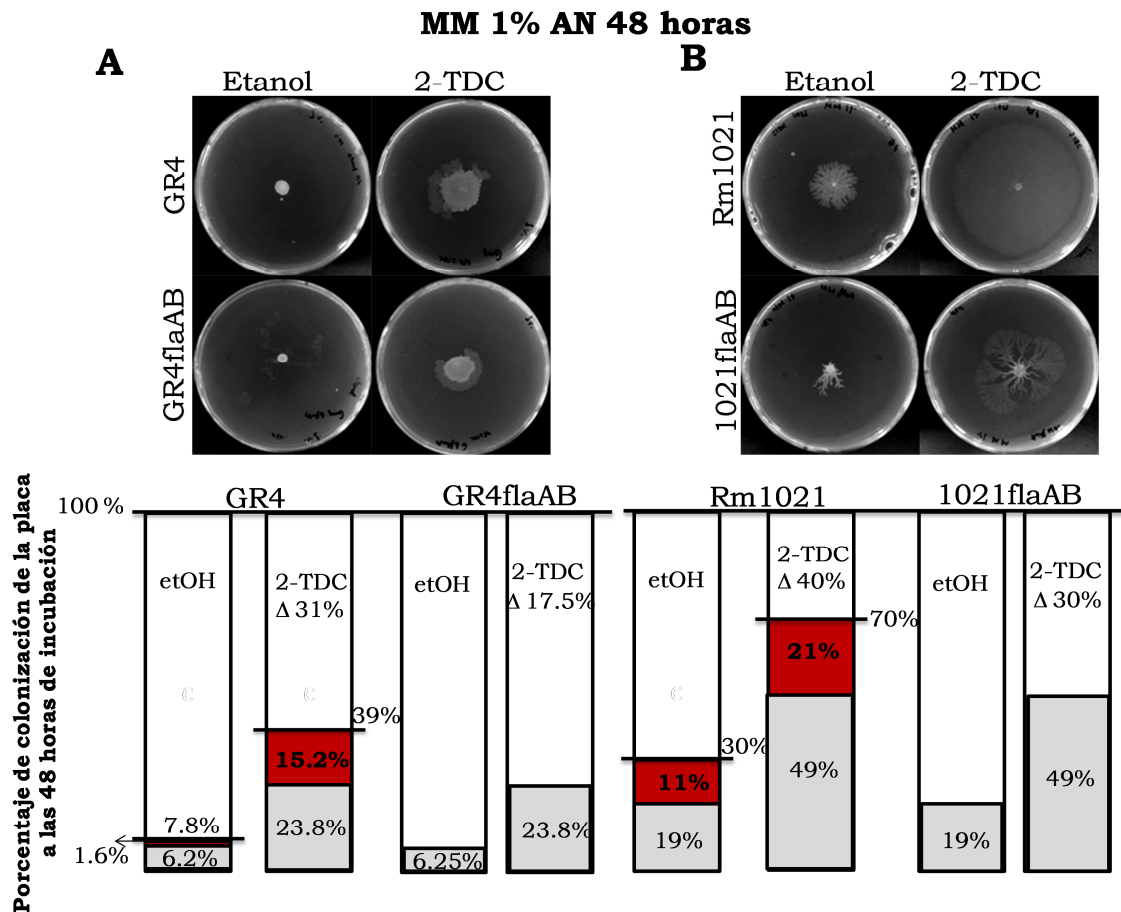


**Figura 16.** Movilidad en superficie mostrada por las cepas de *S. meliloti* GR4fadD y sus derivados aflagelados *flaAB* y *flgK* tras 24 (A) ó 48 (B) horas de incubación con etanol (etOH) o 2-TDC. Se muestran gráficas indicando el valor medio de expansión de cada cepa con los diferentes tratamientos aplicados (superior), fotos representativas (centro), así como gráficas en las que se representa el porcentaje de expansión de la colonia debido a acción flagelar o a otro tipo de translocación independiente de flagelos (inferior) y las El porcentaje de colonización de cada cepa se ha estimado teniendo en cuenta el diámetro medio de dispersión de la colonia en relación al diámetro de la placa (8 cm). □ Movimiento en superficie independiente de acción flagelar. ■ Movimiento en superficie dependiente de acción flagelar o *swarming*. □ Porcentaje de placa no colonizada. El porcentaje de colonización debido a acción flagelar se ha calculado como aquél que presenta la cepa flagelada tras sustraer el porcentaje de colonización mostrado por la derivada aflagelada *flaAB*. Los valores proceden un un mínimo de tres experimentos independientes con al menos tres réplicas técnicas. Las barras representan el error típico con un nivel del confianza del 95%. Letras idénticas indican que no hay diferencias significativas según un test de ANOVA de un factor ( $P \leq 0.05$ ).

Como ya se ha mencionado, en condiciones más restrictivas (MM 1% AN) el efecto que ejerce la 2-TDC en la movilidad en superficie es más notorio. Para conocer el tipo de movilidad que estimula esta metilcetona en alta concentración de agar, hemos comparado la expansión media tanto de GR4 como de Rm1021 (figura 17) tras 48 horas de incubación en presencia de esta sustancia (momento en el que las diferencias son más llamativas), con respecto a la de sus derivados aflagelados *flaAflaB*.

Como se puede apreciar en la figura 17, al incrementar la concentración de agar a 1% se observa una notable disminución de la capacidad de translocación en superficie de GR4, impidiéndose probablemente, la adecuada rotación flagelar. En estas condiciones, la 2-TDC multiplica por cinco la capacidad de expansión en superficie de GR4 y por 3 la de GR4flaAB, por lo que se confirma que la 2-TDC estimula en GR4 translocación dependiente e independiente de flagelos.

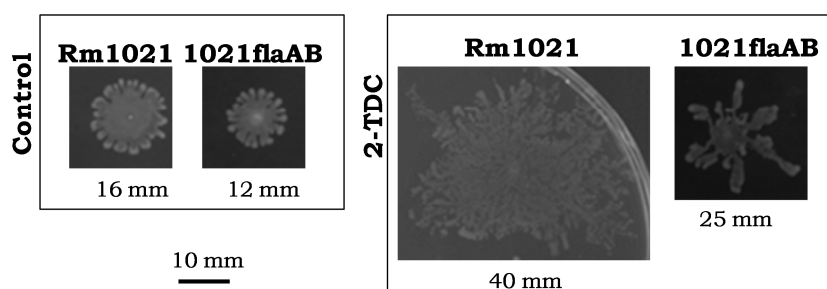
El efecto que la 2-TDC tiene sobre la movilidad de Rm1021 (figura 17) es menos llamativo que para GR4, ya que en este caso sólo ve aumentada su capacidad de colonización aproximadamente dos veces en presencia de esta sustancia después de 48 horas de incubación. No obstante, la comparación del comportamiento de Rm1021 y el derivado aflagelado *flaAB* en presencia de 2-TDC, nos permite concluir que al igual que ha sido observado para GR4, en Rm1021, la metilcetona estimula tanto la translocación independiente como la dependiente de flagelos.



**Figura 17.** Movilidad en superficie mostrada por las cepas de *S. meliloti* GR4 (A) y Rm1021 (B) así como la de sus derivados aflagelados *flaAB* tras 48 horas de incubación con etanol (etOH) o 2-TDC. Se muestran las fotos representativas (A), así como gráficas en las que se representa el porcentaje de expansión de la colonia debido a acción flagelar o a otro tipo de translocación independiente de flagelos (inferior). El porcentaje de colonización de cada cepa se ha estimado teniendo en cuenta el diámetro medio de dispersión de la colonia en relación al diámetro de la placa (8 cm). □ Movimiento en superficie independiente de acción flagelar. ■ Movimiento en superficie dependiente de acción flagelar o *swarming*. □ Porcentaje de placa no colonizada. El porcentaje de colonización debido a acción flagelar se ha calculado como aquél que presenta la cepa flagelada tras sustraer el porcentaje de colonización mostrado por la derivada aflagelada *flaAB*. Los valores proceden de dos experimentos independientes con al menos tres réplicas técnicas.

### 3.2.2 Análisis transcriptómico de *S. meliloti* Rm1021 en presencia de 2-TDC.

Como se ha mencionado en el apartado 3.2 de este capítulo, los primeros ensayos que pusieron de manifiesto el efecto estimulador de la 2-TDC sobre la movilidad en superficie de cepas de *S. meliloti* se realizaron en MM semisólido utilizando agar Pronadisa (0.6%) (figuras 12B y 18), medio rutinariamente utilizado para estos ensayos antes de detectar los ya mencionados problemas con el agar. Ya desde aquel momento, y con el objetivo de identificar el mecanismo molecular responsable de dicho efecto, se planteó realizar un estudio transcriptómico utilizando la metodología de los microarrays, basados en el genoma de la cepa Rm1021. Así, se decidió realizar un análisis de expresión génica global de la cepa Rm1021 en presencia/ausencia de este compuesto tanto en medio mínimo (MM) líquido como medio semisólido (MM 0.6% agar Pronadisa).



**Figura 18.** Ensayos de movilidad en superficie de Rm1021 y su derivado aflagelado en MM 0.6% agar Pronadisa en ausencia (control) y presencia de 2-tridecanona (2-TDC) 50  $\mu$ M, tras 24h de incubación.

Para el análisis transcriptómico de células crecidas en medio líquido, la 2-TDC se adicionó a una concentración final de 50  $\mu$ M a un cultivo de Rm1021 que previamente se había dejado crecer en MM líquido hasta alcanzar una DO de 0.5. Al cultivo control se adicionó el mismo volumen de etanol. Ambos cultivos se volvieron a incubar a 28°C en agitación y transcurridas 1h y 4h se procedió a la recogida de las células (DO de los cultivos de 0.6 y 0.8, respectivamente).

Del transcriptoma de células recogidas tras 1h de incubación con 2-TDC y etanol, únicamente se obtuvieron 15 genes diferencialmente expresados (3 más expresados y 12 reprimidos en presencia de la metilcetona), con ligeros niveles de inducción o represión. Del transcriptoma de células recogidas tras 4 horas de incubación con la sustancia problema, únicamente se obtuvieron 2 genes diferencialmente expresados (inducidos). De estos resultados podemos

concluir que la presencia de 2-TDC a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  no induce diferencias notables en expresión génica en cultivos líquidos de Rm1021.

Pensando en la posibilidad de que la 2-TDC sólo ejerciese su efecto sobre células crecidas en superficie, se decidió realizar un nuevo análisis transcriptómico comparando los ARNs de células de Rm1021 crecidas en MM semisólido en ausencia/presencia de la metilcetona. La siembra e incubación de las células se realizó siguiendo el mismo protocolo utilizado previamente en el grupo en análisis transcriptómicos de células crecidas en similares condiciones (Nogales et al. 2010), salvo por el hecho de añadir 2-TDC o etanol (control) a las placas. La recogida de las células para el aislamiento de ARN se realizó tras 7 horas de incubación previa comprobación de que los tratamientos control y con 2-TDC no afectaban la viabilidad celular en estas condiciones (datos no mostrados). Según los criterios de selección de  $A > 7$ ;  $p < 0.05$ ;  $1 < M < -1$ , se identificaron 88 genes diferencialmente expresados, 49 se expresaban más en presencia de la 2-TDC y 39 mostraban menor expresión en presencia de la metilcetona (Tablas A1 y A2 en Anexos A3.2).

Aproximadamente un 29% de los genes diferencialmente expresados formaban parte de supuestos operones en los que dos o más genes aparecían con una expresión diferencial en nuestras condiciones experimentales. Teniendo en cuenta la distribución de los genes del genoma de Rm1021 entre los distintos replicones, se observó cierta desviación hacia genes del cromosoma en detrimento del replicón pSymB de *S. meliloti* Rm1021.

En la tabla 2 se muestra un resumen del número de genes inducidos o reprimidos en respuesta a 2-TDC distribuidos de acuerdo a su localización en el genoma y su pertenencia a las distintas categorías funcionales, así como la distribución de estos en los distintos replicones de *S. meliloti* Rm1021 y el porcentaje que representan con respecto al total.



	<b>Cromosoma</b>	<b>pSymA</b>	<b>pSymB</b>	<b>TOTAL</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>Hipotéticas proteínas</b>	16 6 10	1	2	19 9 10	21.59%
<b>Genes implicados en procesos celulares</b>	21 13 8	11 10 1	4 1 3	36 24 12	40.9%
<b>Reguladores transcripcionales</b>	5	0	2	7	7.95%
<b>Elementos estructurales</b>	0	0	1	1	1.13%
<b>Genes implicados en el metabolismo de pequeñas moléculas</b>	7	1	5	13 1 12	14.77%
<b>Genes implicados en el metabolismo intermediario</b>	4	0	3	7	7.95%
<b>Genes implicados en el metabolismo de macromoléculas</b>	1	0	0	1	1.13%
<b>Genes implicados en fijación de nitrógeno</b>	0	4	0	4	4.54%
<b>TOTAL DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS</b>	54 (61.36%) 19 35	17 (19.31%) 16 1	17 (19.31%) 4 13	88 39 49	100%

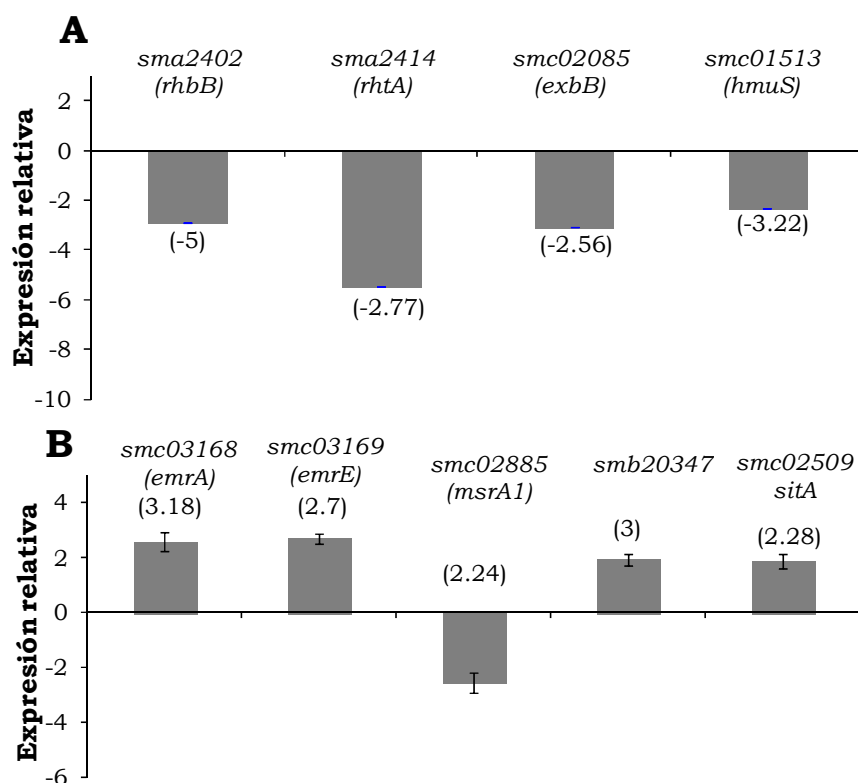
**Tabla 2.** Categorías funcionales en que se distribuyen los genes diferencialmente expresados en cada uno de los replicones obtenidos en el análisis transcriptómico de Rm1021 tras crecimiento en MM semisólido durante 7 h en presencia *vs* ausencia de 2-TDC. En verde se muestran aquellos genes cuya expresión se encuentra disminuida en presencia de 2-TDC y en rojo se indican el número de genes de cada categoría más expresados en su presencia. Se incluye el número total de genes pertenecientes a las distintas categorías funcionales y el porcentaje que ello representa con respecto al cómputo global de genes diferencialmente expresados.

Los niveles de inducción/represión encontrados en este análisis no fueron especialmente altos (6 y 7, respectivamente). El primer hecho que llamó la atención de este transcriptoma fue la ausencia de genes flagelares o relacionados con motilidad entre los genes con expresión diferencial, teniendo en cuenta que estábamos analizando el efecto de un compuesto que induce movilidad en superficie. La categoría funcional más representada fue la de genes implicados en procesos celulares (40.9%) seguida de la que engloba a genes que codifican proteínas de función aún desconocida (21.59%). Entre los genes cuya expresión se elevó en respuesta a 2-TDC podemos destacar hasta 9 genes que codifican proteínas implicadas en reacciones de oxidorreducción, varios reguladores transcripcionales que controlan genes de resistencia (tolerancia) a estreses (*smc01226*, *smc03169*, *smb20347*, *smc01842*), componentes de transportadores tipo ABC, hipotéticas proteínas de pequeño

tamaño, y genes relacionados con el metabolismo de los aminoácidos metionina y cisteína (*bmt*, *metH*, *metF*, *cysH*, *cysK1*). El gen que apareció como más inducido fue *azoR* que potencialmente codifica una azorreductasa. En *E. coli*, AzoR es una quinona reductasa que proporciona resistencia a estreses que actúan específicamente sobre grupos tiol, y su expresión se induce en presencia de varios compuestos como la menadiona que inducen radicales libres (Liu *et al.*, 2009). También apareció como gen inducido en respuesta a 2-TDC *msrA1* que codifica una sulfóxido-reductasa de metioninas que forman parte de péptidos, una proteína que desempeña un papel importante en proteger frente al daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas. Esto junto a la inducción de genes para la síntesis de glutamato y cisteína que podrían activar la producción del tripéptido glutatión, un potente antioxidante, podrían ser indicativos de que la 2-TDC está generando un estrés oxidativo, que en cualquier caso no repercute en crecimiento bacteriano. Además de estas observaciones, lo que más nos llamó la atención fue la menor expresión en presencia de 2-TDC de los 10 genes relacionados con la regulación, síntesis, y transporte y del sideróforo Rhb1021 (*rhbABCDE*, *rhbG*, *rhtA*, *rhtX* y *rhrA*), además de otros 10 genes relacionados con captación y metabolismo de hierro. Entre ellos: los genes *exbB* y *exbD* que codifican los componentes de membrana interna que forman parte del complejo energizante dependiente de TonB requerido por sistemas de captación de sideróforos acoplejados a Fe<sup>3+</sup> (Wandersman and Delepelaire, 2004), *fbpA* que codifica el componente periplásmico para el transporte de Fe<sup>3+</sup>, genes para la captación de compuestos asociados a grupo hemo (*hmuU*, *hmuV*, *hmuT*, *hmuS*, *shmR*), el gen *fhuP* que codifica la permeasa que participa en captación de sideróforos tipo hidroxamato como ferricromo y ferrioxamina B o el gen *fhuF* que codifica una sideróforo reductasa (Cuiv *et al.*, 2008; Wexler *et al.*, 2001)). Curiosamente, estos genes que constituyen el 50% de los genes con expresión disminuida en respuesta a 2-TDC, forman parte de la categoría funcional que aparecía inducida en el transcriptoma del mutante *fadD* en condiciones inductoras de *swarming* (Nogales *et al.*, 2010).

Con objeto de poder validar los resultados de este transcriptoma, analizamos la expresión de algunos de los genes identificados en este análisis mediante reverso transcripción del ARN y PCR a tiempo real. Para ello, se escogieron 4 genes que aparecieron con expresión reprimida en respuesta a 2-TDC: los genes *rhbB*, *rhtA*, *exbB* y *hmuS*, implicados en la captación de hierro y, por

otro lado, se seleccionaron otros 5 genes que mostraron mayor expresión (*smc03168*, *smc03169*, *smc02885*, *smb20347* y *sitA*). Los dos primeros genes han sido recientemente descritos en *S. meliloti* como uno de los componentes de un sistema de resistencia a multidroga (*emrA*) y su regulador transcripcional (*emrR*). Se ha visto que mutaciones que afectan al regulador conllevan, entre otros fenotipos, menor resistencia a choque térmico y pH ácido, así como alteraciones en respuesta a flavonoides. Sin embargo, una mutación doble restaura los fenotipos descritos anteriormente, salvo la vulnerabilidad a choque térmico (Santos *et al.*, 2014). El gen *smc02885*, *msrA*, codifica una sulfóxido-reductasa de metioninas que forman parte de péptidos, una proteína que desempeña un papel importante en proteger frente al daño oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno sobre las proteínas, mientras que *sitA* (*smc02509*) es una proteína implicada en el transporte de manganeso. Finalmente, *smb20347*, es uno de los reguladores transcripcionales inducidos en este transcriptoma. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 19.



**Figura 19.** Valores de expresión relativa obtenidos mediante PCR a tiempo real de los genes menos expresados en presencia de la 2-TDC (A) y de los más expresados en presencia de ésta (B). Entre paréntesis se muestra el valor 2<sup>M</sup> obtenido en el análisis por *microarrays*. Los resultados corresponden a las medias de al menos dos experimentos biológicos independientes con tres repeticiones técnicas. Las barras indican el error estándar con un nivel de confianza del 95%.

Los datos de la PCR a tiempo real confirmaron los resultados del *microarray* para todos los genes salvo en el caso de *smc02885 (msrA1)*, ya que en el transcriptoma aparece como más inducido en presencia de la metilcetona. Sin embargo, este resultado aparentemente contradictorio puede ser explicado por el hecho de que este gen posee un valor de “p” próximo al umbral de selección, por lo que probablemente debería quedar fuera de la selección inicial. Una vez validado nuestro *array*, hemos podido concluir que la 2-TDC parece desencadenar en Rm1021 una situación de estrés induciendo la expresión de genes relacionados con bombas de expulsión de compuestos xenobióticos y de tolerancia a estrés, así como proteínas que protegen frente a daño oxidativo. Por otro lado, actúa limitando la expresión de genes relacionados con captación de hierro, entre ellos los genes de biosíntesis de rizobactina 1021 esenciales en la movilidad en superficie de esta bacteria.

# **CAPÍTULO III.**

## **DISCUSIÓN**



La movilidad *swarming* está sujeta a una serie de desafíos que no aparecen durante el desarrollo de otro tipo de moviidades como puede ser el *swimming*, desafíos que han de ser superados para que tenga lugar la translocación bacteriana sobre una superficie. Ordenados de acuerdo a su importancia, entre los desafíos que las bacterias han de superar para “navegar en superficie” están el de i) atraer a la superficie la cantidad suficiente de agua para embeber a las células y así facilitar el movimiento flagelar, ii) superar las fuerzas de fricción (entre célula y superficie del medio y entre células) definidas como fuerzas electrostáticas entre dos superficies que se deslizan entre sí, y cuya magnitud depende de la naturaleza del material que conforma las superficies y si éstas están secas o lubricadas, y iii) superar la tensión superficial del fluido en movimiento, resultante de la tendencia de las moléculas de agua a permanecer unidas impidiendo la humectación del territorio no colonizado que precede a la colonia (Partridge and Harshey, 2013b). Los mecanismos utilizados por las bacterias para vencer estos obstáculos son muy variados. Así, la producción de diversos polisacáridos, LPS y osmolitos se ha relacionado con la hidratación de la colonia, mientras que el incremento de la fuerza de propulsión de los flagelos mediante diversas estrategias, y la producción de agentes surfactantes ayuda a superar las fuerzas de fricción y de tensión superficial (Partridge and Harshey, 2013b).

Como ya se ha comentado, hasta el momento de la realización de este estudio la cepa GR4 de *S. meliloti* era incapaz de desplazarse en superficie de medio semisólido. Sólo la generación de una mutación *fadD* inducía translocación en superficie en esta cepa, indicando que, aunque la bacteria tenía el potencial necesario para desarrollar este tipo de movilidad, en las condiciones de ensayo empleadas no conseguía superar al menos alguno de los desafíos importantes. Las investigaciones realizadas en este estudio nos han llevado a la identificación de dos factores que permiten el desarrollo de movilidad en superficie en GR4, permitiendo así su caracterización: el empleo de agar Noble como agente gelificante del MM y la adición de 2-tridecanona (2-TDC).

### **Agar Noble y translocación en superficie de *S. meliloti*: Mecanismos implicados.**

La naturaleza del agar empleado en los medios de ensayo de movilidad *swarming* es muy importante, especialmente en el caso de las bacterias consideradas *swarmer* moderadas. Así, en *E. coli* y *Salmonella* el *swarming* se puso de manifiesto por primera vez al usar el agar Eiken comercializado por una empresa japonesa (Harshey and Matsuyama, 1994). Problemas para poner de manifiesto la movilidad en superficie de *S. meliloti* utilizando el agar rutinariamente empleado en estos ensayos (agar purificado Pronadisa) (Soto *et al.*, 2002; Nogales *et al.*, 2010, 2012) nos llevó a identificar el agar Noble Difco (BD) como un agente gelificante que proporciona condiciones más permisivas y reproducibles para la observación y estudio de este tipo de translocación no sólo de *S. meliloti* sino también en otros rizobios. Desconocemos a qué se debe esta propiedad del agar Noble ya que las características físicas son muy similares a las del agar Pronadisa. Es probable que la mayor pureza y menor contenido en inorgánicos del agar Noble esté entre las razones que promueven la movilidad en superficie, quizás facilitando la extracción de agua y humectación de la colonia. En estas nuevas condiciones más permisivas sigue existiendo una influencia de la densidad celular ya que a mayor densidad de inóculo, mayor es la translocación en superficie observada en las distintas cepas. Sin embargo, la dependencia de un inóculo mínimo sólo se ha podido detectar para el caso de la cepa GR4fadD. Por otro lado, se ha podido confirmar el papel del hierro (Fe) en el control de la movilidad en superficie aunque con ciertos matices con respecto a lo ya conocido (Nogales *et al.*, 2010). Así, hemos comprobado que la presencia de una alta concentración de Fe influye negativamente en la translocación en superficie de las cepas silvestres, especialmente en GR4, pero no llega a impedirla. Este efecto sin embargo, no es observable en mutantes *fadD*, corroborándose lo ya descrito. En este estudio, además, se ha demostrado que condiciones de deficiencia de Fe reducen y alteran significativamente la movilidad en superficie de la cepa 1021fadD, a través de mecanismos que no han sido investigados en este trabajo. No obstante, todos estos datos siguen poniendo de manifiesto la estrecha conexión existente entre la concentración de Fe en el medio y la actividad FadD en el control de la movilidad en superficie en *S. meliloti* aunque aún se desconocen los elementos a través de los cuales se establece dicha relación.



El empleo del agar noble junto con la obtención de distintos derivados aflagelados de las cepas GR4 y Rm1021, nos ha permitido caracterizar el movimiento mostrado por estas cepas así como la de sus derivados *fadD*, al mismo tiempo que hemos puesto de manifiesto fenómenos hasta ahora desconocidos en *S. meliloti*. Nuestros resultados demuestran que GR4 y Rm1021 utilizan mecanismos distintos para el desplazamiento en superficie. El tipo de translocación empleado por GR4 es *swarming* ya que es absolutamente dependiente de flagelos, como lo demuestra el comportamiento inmóvil sobre superficie de un derivado *flaAB* incapaz de sintetizar filamentos flagelares. A diferencia de GR4, Rm1021 se desplaza en superficie utilizando mayoritariamente un tipo de translocación que es independiente de acción flagelar ya que el derivado *flaAB* coloniza la superficie casi tan eficientemente como la cepa flagelada. En el mecanismo que media en el desplazamiento en ausencia de flagelos, la producción del sideróforo rizobactina 1021 (Rhb1021), producido por Rm1021 pero no por GR4, desempeña un papel fundamental como así lo revela el comportamiento de un mutante *rhbD*. La importancia de Rhb1021 en el desplazamiento en superficie de Rm1021, probablemente actuando como surfactante, ya se había constatado en trabajos anteriores del grupo utilizando agar Pronadisa (Nogales *et al.*, 2010, 2012; Amaya-Gómez, 2013). Los nuevos resultados obtenidos en agar Noble, sin embargo, revelan que un mutante defectivo en la producción del sideróforo no es totalmente inmóvil como sí lo es el derivado *flaAB* de GR4. Esto indica que además de Rhb1021, existen otros factores capaces de promover el movimiento en superficie en Rm1021 ya sea por mecanismos dependientes o independientes de flagelos y que están aún por identificar.

Por otro lado, hemos podido constatar que el estado de ensamblaje del flagelo parece repercutir en el desplazamiento en superficie de las cepas de *S. meliloti*, un fenómeno hasta ahora no observado, aunque también en este caso con efectos distintos dependiendo de la cepa. Así, en GR4, el mutante aflagelado *flgK* es capaz de desarrollar cierta movilidad en superficie contrastando con el comportamiento inmóvil del mutante *flaAB* (fig. 4A). Por el contrario, un mutante aflagelado *flgE* de Rm1021 se encuentra severamente afectado en desplazamiento en superficie, contrastando con el gran desplazamiento mostrado por el derivado *flaAB* de esta cepa (figuras 5A y 6A). Los mutantes *flgK* y *flgE* teóricamente son incapaces de completar el *Hook Basal Body* (HBB) del flagelo (el mutante *flgK* por no producir una de las proteínas asociadas al

gancho flagelar, y el mutante *flgE* al no producir la proteína del gancho). En diversas bacterias, la formación de un HBB perfectamente ensamblado es un punto de chequeo clave que controla la expresión de genes flagelares tardíos (Smith and Hoover, 2009). El caso más ampliamente estudiado es el de enterobacterias: la finalización del HBB provoca un cambio de especificidad de sustrato del T3SS del flagelo que pasa de transportar proteínas del cuerpo basal y gancho, a transportar otras proteínas, entre ellas el factor anti-sigma FlgM. La secreción de FlgM libera el correspondiente factor sigma  $\sigma^{28}$ , FliA, requerido para la expresión de genes flagelares tardíos como el que codifica la flagelina. Se sabe que genes no flagelares también pueden verse sometidos a un control coordinado con el estado del ensamblaje del flagelo. Es el caso de la expresión de algunos genes de virulencia en *Salmonella*, *Proteus* o *Yersinia* (Allison *et al.*, 1992; Duan *et al.*, 2013; Iyoda *et al.*, 2001; Young *et al.*, 1999). Especialmente curioso y más cercano a nuestras observaciones es el caso de *P. syringae* pv *syringae* (Pss) donde se ha demostrado que la síntesis de un surfactante (ácido 3-(3-hidroxi-alcanoloxi) alcanico, o HAA) que facilita el *swarming* en cepas incapaces de producir el lipopéptido siringofactina, se regula de manera coordinada con el estado de ensamblaje del flagelo: mutaciones en genes necesarios para las etapas tempranas del ensamblaje abolen o reducen la producción de HAA, mientras que mutaciones en genes de la flagelina o que participan en glicosilación de la flagelina incrementan la producción de este surfactante (Burch *et al.*, 2012). Esta co-regulación se ha relacionado con la necesidad de lubricar el flagelo en ambientes especialmente viscosos para evitar su rotura. Si relacionamos el movimiento en superficie mostrado por las cepas de *S. meliloti* con la producción de un teórico surfactante, el comportamiento de Rm1021 parece ajustarse al descrito en Pss. Nos planteamos si la producción de Rhb1021, sideróforo con actividad surfactante que desempeña un papel importante en la movilidad en superficie de esta bacteria, pudiera ser el surfactante cuya regulación estuviese coordinada con el estado de ensamblaje del flagelo y que su síntesis se viera abolida o reducida en ausencia de un HBB. Sin embargo, ensayos CAS realizados tanto en MM líquido como semisólido de cultivos de Rm1021, 1021flaAB y 1021flgE, no han revelado diferencias significativas en los niveles de producción del sideróforo (datos no mostrados). No podemos descartar sin embargo, cambios en la estructura del sideróforo que afecten a sus propiedades surfactantes. En GR4, por el contrario, la producción del factor

que promueve movimiento independiente de flagelos sólo parece activarse en ausencia de HBB. En la fig 20 se representa un posible modelo para explicar el comportamiento de mutantes aflagelados de GR4.

Según este modelo, mutaciones que afectan a etapas tempranas del ensamblaje del flagelo provocan la acumulación de una proteína reguladora que activaría un mecanismo de translocación en superficie denominado FIT1: desplazamiento en superficie independiente de flagelos (FIT, *Flagella-Independent Translocation*), por ej. un surfactante. En la situación del mutante *flaAB*, la proteína reguladora es secretada al medio externo, por lo que su concentración intracelular es insuficiente para activar el mecanismo FIT1 a un nivel que permita el desplazamiento de un mutante aflagelado GR4*flaAB*. En el mutante *flgK*, el bloqueo en la secreción de la proteína reguladora provoca el incremento en su concentración intracelular, activándose notablemente el mecanismo FIT1, lo que permite cierto desplazamiento en superficie de GR4*flgK*.

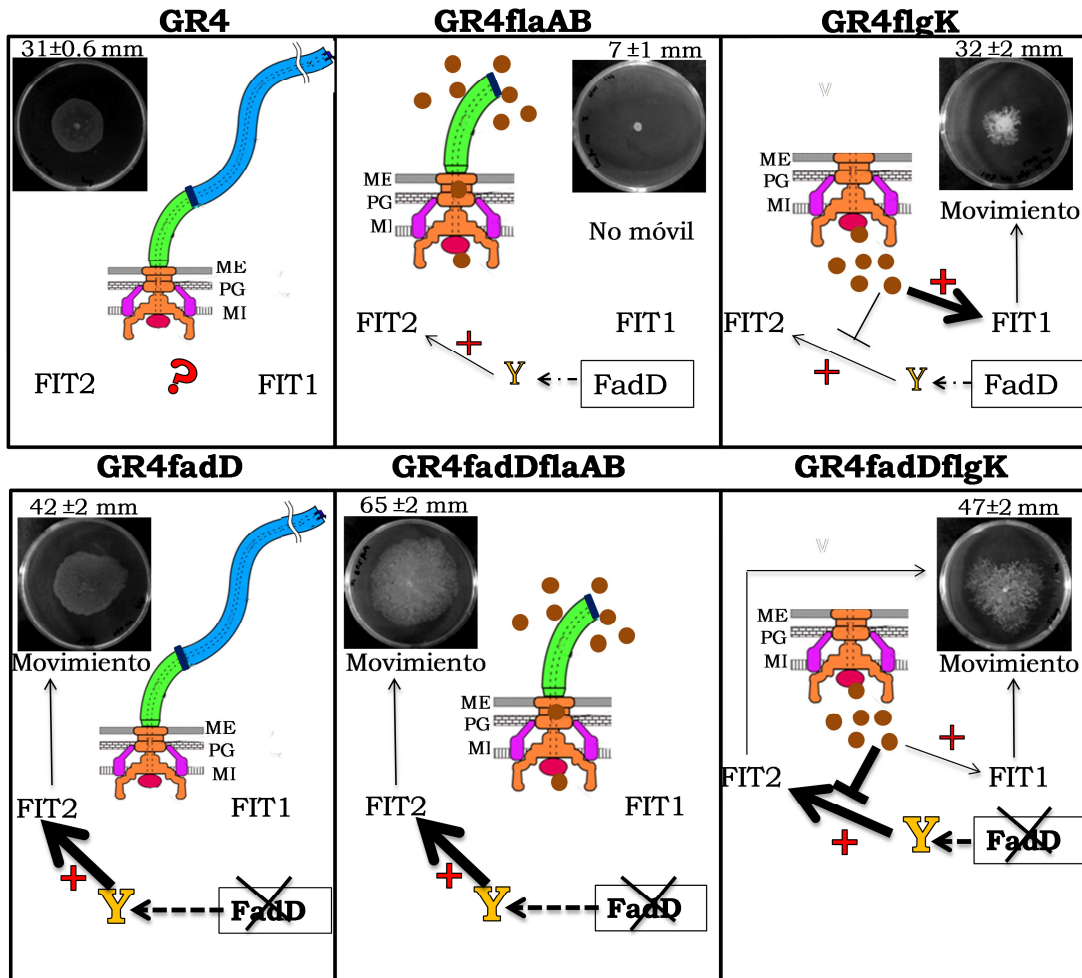
La disponibilidad de los mutantes aflagelados también nos ha permitido caracterizar el movimiento en superficie mostrado por mutantes *fadD* de *S. meliloti*. Una vez más, el efecto que ocasiona la mutación sobre el desplazamiento en superficie en *S. meliloti* es distinto dependiendo del fondo genético en que se analice. En GR4, la pérdida de función del gen *fadD* incrementa el desplazamiento en superficie tal y como hasta ahora se había descrito en trabajos del grupo (Soto *et al.*, 2002; Nogales *et al.*, 2010). Aquí además, demostramos que dicho incremento se debe a la estimulación de un movimiento independiente de flagelos que se ve ligeramente reducido, pero no abolido, en ausencia de un HBB. Nuestra hipótesis es que la mutación *fadD* que afecta al metabolismo lipídico, induce la acumulación de un compuesto (Y) que de manera directa o indirecta promueve el movimiento en superficie incluso en ausencia de flagelos (fig. 20). El aislamiento de 2-TDC asociada a mutantes *fadD*, unido al hecho de que esta metilcetona estimula el desplazamiento en superficie de cepas silvestres pero el efecto es menor en un mutante *fadD*, parecen sugerir que el compuesto Y es 2-TDC.

En nuestro modelo la acumulación del compuesto “Y” generada por la mutación *fadD* estimula significativamente un mecanismo de translocación independiente de flagelos, FIT2, y que es responsable de la gran translocación

mostrada por GR4fadDflaAB, casi idéntica a la desarrollada por GR4fadD. El compuesto “Y” puede encontrarse en un fondo *fadD*<sup>+</sup>, pero a concentraciones muy inferiores, por lo que el mecanismo FIT2 es insuficiente para permitir la translocación en superficie de un GR4flaAB. Para explicar el comportamiento del doble mutante GR4fadDflgk proponemos que la proteína reguladora, cuya secreción por el T3SS del flagelo se ve impedida en el mutante *flgK*, actúa como represor del mecanismo inducido por “Y” y que lleva a FIT2. No obstante la actividad represora sería insuficiente, permitiendo cierta manifestación del mecanismo FIT2, lo que explica el mayor desplazamiento mostrado por el mutante GR4fadDflgk comparado con el de GR4flgk.

La naturaleza del factor o factores que impactan en el movimiento en superficie de GR4 y Rm1021 en ausencia de flagelos, si son el mismo o distintos, así como las bases moleculares que rigen su control de manera coordinada con el ensamblaje del flagelo son líneas de investigación futuras del grupo en el que se ha realizado esta Tesis doctoral.

A diferencia de GR4, la ausencia de un *fadD* funcional en Rm1021 no estimula la translocación bacteriana en superficie (figura 5 y 6), y sorprendentemente, la mutación *fadD* interfiere negativamente con el movimiento independiente de flagelos mostrado por la cepa 1021flaAB (efecto contrario al observado en GR4), mientras que prácticamente no tiene efecto alguno en un mutante afectado en etapas más tempranas del ensamblaje del flagelo (*flgG*). Además, confirmamos cómo la mutación *fadD* alivia el defecto en movilidad en superficie de un mutante *rhb*, aunque no llegan a recuperarse los valores mostrados por una cepa isogénica productora del sideróforo. Aunque la hipótesis de la producción en los mutantes *fadD* de un compuesto Y que favorece la movilidad en superficie, podría explicar la complementación parcial del mutante *rhbD*, aún es difícil especular sobre el mecanismo por el cual la mutación *fadD* interfiere con el desplazamiento del mutante *flaAB*. En la búsqueda de un modelo, ayudaría mucho conocer el factor que promueve el desplazamiento en superficie independiente de flagelos típico de 1021flaAB cuya producción parece requerir un HBB.



**Figura 20.** Modelo propuesto para explicar el comportamiento en superficie mostrado por distintas cepas de GR4. Membrana externa (ME), peptidoglucano (PG) y membrana interna (MI). Estructura del flagelo: desde la parte más interna a la más externa encontramos: ■ sistema de secreción tipo III; ■ cuerpo basal; ■ complejo Mot; ■ gancho; ■ zona de unión entre el gancho y el filamento; ■ filamento completo. Para mejorar la visualización, se muestra la mutación *flgK* como ausencia total de gancho. Líneas discontinuas indican resultado de la actividad directa o indirecta. Flecha gruesa indica mayor actividad/efecto. ● Proteína reguladora, + activación, - represión, Y producto relacionado con la actividad FadD acumulado en mutantes *fadD*. FIT1: movimiento independiente de flagelos (*Flagella-Independent Translocation*) independiente de Y y activado por la proteína reguladora; FIT2: movimiento dependiente de Y y reprimido por la proteína reguladora. Se desconoce la identidad de FIT y su posible producto. Se muestra imagen de la movilidad en superficie desarrollada por cada cepa en cuestión junto con la media y el error típico de tres experimentos independientes medido en milímetros (mm) tras 48 horas de incubación, salvo en el caso de GR4 y su derivado *fadD*, que se muestran imágenes a las 24 horas de incubación, período en el que sus diferencias son apreciables.

### **Mecanismos que gobiernan la estimulación de movilidad en superficie de *S. meliloti* en respuesta a 2-TDC**

La 2-TDC se identificó durante la caracterización bioquímica de mutantes *fadD* de *S. meliloti* como un compuesto que se acumulaba en estos mutantes pero no en las cepas silvestres, y que añadido de forma exógena estimula el desplazamiento en superficie de distintas bacterias (Soto *et al.*, en preparación). En este estudio hemos comprobado que el efecto ejercido por la 2-TDC en *S. meliloti* es específico de la movilidad en superficie (no afecta la movilidad *swimming*) y dependiente de dosis, siendo la concentración óptima 25-50  $\mu\text{M}$ .

En una primera aproximación destinada a identificar el mecanismo mediante el cual la 2-TDC es capaz de inducir translocación en superficie en cepas de *S. meliloti*, se ha caracterizado el tipo de translocación desarrollada por GR4 y Rm1021 en respuesta a la metilcetona, comparando su comportamiento con el de los correspondientes derivados aflagelados. Los resultados obtenidos claramente indican que la 2-TDC promueve la movilidad en superficie de estas cepas estimulando tanto el movimiento dependiente como el independiente de flagelos. Al analizar el comportamiento de mutantes *fadD* de GR4 a 2-TDC, el efecto observado sobre el desplazamiento en superficie ha sido mínimo, lo que concuerda con que el gen *fadD* y 2-TDC parecen actuar en la misma vía de señalización de *S. meliloti* que controla desplazamiento en superficie. Además, puesto que la adición de 2-TDC no mejora el comportamiento en superficie del mutante GR4*fadD**flgK*, la regulación mediada por el estado del ensamblaje del flagelo parece tener su diana aguas abajo en la vía de actuación de 2-TDC.

El análisis transcriptómico de células de Rm1021 en respuesta a 2-TDC nos ha revelado que el efecto a nivel de expresión génica ejercido por esta metilcetona es distinto dependiendo de que las células se encuentren creciendo en medio líquido o sobre una superficie. Mientras que en cultivo líquido, la 2-TDC prácticamente no tiene efecto en regulación génica, células que crecen en MM semisólido responden a su presencia alterando la expresión de un total de 88 genes. Desafortunadamente, este análisis no ha dado demasiada información sobre el mecanismo de actuación de la 2-TDC. No obstante, llama la atención que no hayan aparecido genes flagelares y de movilidad aunque, como se ha comentado, la 2-TDC promueve movimiento

dependiente e independiente de flagelos. Dicho de otra manera, la estimulación del *swarming* provocado por la adición de 2-TDC no es consecuencia de la activación de la expresión de genes relacionados con la movilidad. Una posible explicación es que la 2-TDC favorezca la aparición de una situación (producción de sustancias surfactantes, alteraciones en la superficie celular, mayor actividad del motor flagelar...) en la que el funcionamiento de los flagelos sea más efectivo. Otra posibilidad es que la 2-TDC actúe mediante mecanismos postranscripcionales que no pueden ser detectados con la metodología de los arrays.

De los genes que aparecen con mayores niveles de expresión en respuesta a 2-TDC parece deducirse que esta metilcetona está generando una situación de estrés en Rm1021 ya que se ha detectado la activación de genes que codifican bombas de extrusión de compuestos tóxicos así como genes que pueden tener importancia en tolerancia a estrés oxidativo. En cualquier caso, este estrés no es lo suficientemente intenso como para alterar el crecimiento bacteriano. Sin duda, lo que más llamó la atención de este análisis transcriptómico fue detectar la represión en respuesta a 2-TDC de genes relacionados con el metabolismo y captación de Fe, entre ellos, todos los genes implicados en biosíntesis y utilización de Rhb1021 cuya expresión se encontró activada en un mutante *fadD* en respuesta a condiciones inductoras de movilidad en superficie (Nogales *et al.*, 2010). No se ha determinado si la adición de 2-TDC interfiere con los niveles de producción de sideróforo en Rm1021 aunque sí hemos comprobado que la presencia de la metilcetona, al igual que una mutación *fadD*, consigue recuperar el defecto en movilidad de un mutante *rhb* (datos no mostrados). La obtención y caracterización de mutantes de *S. meliloti* incapaces de mostrar movilidad en superficie en respuesta a 2-TDC podría potencialmente dar las claves del mecanismo de acción de esta metilcetona.





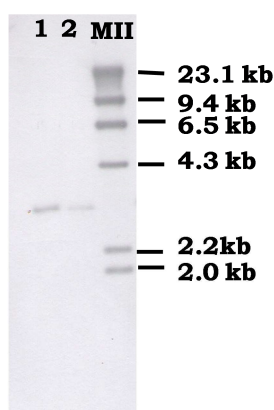
## **CAPÍTULO III.**

### **ANEXOS**



### A3.1 Construcción del mutante 1021fadDrhbD.

Para la obtención del mutante 1021rhbD con la versión mutada del gen *fadD* se realizó una transducción de dicha mutación desde la cepa 1021fadD (cuya secuencia se encuentra interrumpida por un cassette de resistencia a Sm/Spc) a 1021rhbD. La confirmación de la obtención del mutante se realizó mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI*. Como se muestra en la figura A1, en los mutantes se produce la pérdida del alelo silvestre *fadD* y aparece el alelo mutado (fragmento *EcoRI* de 3.27 kb) con el cassette de resistencia a Sm/Spc. Al mutante *fadD* así obtenido se le denominó 1021fadDrhbD. El alelo silvestre representado como un fragmento *EcoRI* de 700 pb presente en Rm1021, no se aprecia en la imagen.



**Figura A31.** Comprobación del mutante 1021fadDrhbD de *S. meliloti* mediante hibridación del ADN genómico digerido con *EcoRI* y usando como sonda un fragmento *EcoRI* interno al gen *fadD*. Carriles: 1, 1021fadDrhbD; 2, 1021fadD; MII, marcador de peso molecular marcado con digoxigenina;

### A3.2 Análisis transcriptómico de genes de *S. meliloti* que responden a la presencia de 2-TDC.

Del transcriptoma de Rm1021, llevado a cabo en medio semisólido tras 7 horas de incubación en presencia de 2-TDC, se obtuvieron 88 genes diferencialmente expresados, de los cuales 49 (Tabla A1) se expresaban más en presencia de la 2-TDC y 39 (TablaA2) mostraban menor expresión génica en presencia de esta metilcetona.

**Tabla A1.** Listado de genes obtenido del transcriptoma de Rm1021 en medio semisólido y en presencia de 2-TDC, que se encuentran más expresados en presencia de esta metilcetona. Se indica el nombre del gen junto con una breve descripción y el valor de M en orden decreciente.

Gen	Descripción	Valor de M
<i>smc01329</i> ( <i>azoR</i> )	Probable FMN-dependent NADH-azoreductase	2,51128881
<i>smb20343</i>	Putative isoquinoline 1-oxidoreductase	2,50188462
<i>smc01814</i>	Probable glutamate synthase small chain protein	2,10519777
<i>smb20342</i>	Putative aldehyde dehydrogenase protein	1,97635932
<i>smc01652</i>	Putative ABC transporter protein	1,95153038

<i>smc01653</i>	Putative ATP-binding ABC transporter protein	1,94930366
<i>smb20573</i>	Putative NADH-dependent FMN reductase protein	1,9274185
<i>smc00092</i> ( <i>cysH</i> )	Phosphoadenosine phosphosulfate reductase	1,89102979
<i>smb20605</i>	ABC transporter, periplasmic solute-binding protein	1,81621482
<i>smc02350</i>	Conserved hypothetical protein	1,81394049
<i>smc02266</i>	Conserved hypothetical protein	1,74198553
<i>smc01328</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,71345798
<i>smc03168</i> ( <i>emrA</i> )	Multidrug efflux system protein	1,67142197
<i>smb20347</i>	Putative transcriptional regulator protein	1,61306063
<i>smc04164</i>	Hypothetical protein	1,53630332
<i>smc00591</i>	Hypothetical/unknown signal peptide protein	1,53246388
<i>smc00029</i>	Hypothetical/unknown protein	1,51019422
<i>smc00562</i>	Putative transcription regulator protein	1,45023876
<i>smc03169</i> ( <i>emrE</i> )	Transcription regulator TetR family	1,43336477
<i>smb21136</i>	Putative amino acid uptake ABC transporter permease protein	1,4299245
<i>smb20759</i> ( <i>phnG</i> )	Putative C-P (carbon-phosphorus lyase component protein	1,32369133
<i>smc04325</i> ( <i>bmt</i> )	Betaine-homocysteine methyltransferase	1,30116868
<i>smc02708</i>	Conserved hypothetical protein	1,29422439
<i>smb21135</i>	Putative amino acid uptake ABC transporter periplasmic solute-binding protein precursor	1,26690072
<i>smc01169</i> ( <i>ald</i> )	Probable alanine dehydrogenase oxidoreductase protein	1,26630226
<i>smc01523</i> ( <i>emrE</i> )	Putative methyl viologen/ethidium resistance transmembrane protein	1,26344823
<i>smc01820</i>	Putative n-carbamyl-l-amino acid amidohydrolase protein	1,2578331
<i>smc01226</i>	Putative transcription regulator protein	1,25254246
<i>smc03112</i> ( <i>metH</i> )	Probable 5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase (methionine synthase, vitamin-B12 dependent isozyme) protein	1,21649355
<i>sma0585</i> ( <i>nrtA</i> )	Nitrate transporter, periplasmic nitrate binding protein	1,21253549
<i>smc02509</i> ( <i>sitA</i> )	Manganese ABC transporter periplasmic substrate binding protein	1,18948086
<i>smc00421</i> ( <i>cysK1</i> )	Probable cysteine synthase a (o-acetylserine sulfhydrylase) protein	1,17630848
<i>smc02178</i>	Hypothetical protein	1,15864209
<i>smb20674</i>	Putative transcriptional regulator, LacI family protein	1,13764114
<i>smc01843</i> ( <i>metF</i> )	Probable 5-methyltetrahydrofolate--homocysteine methyltransferase	1,1351848
<i>smc00409</i>	Hypothetical signal peptide protein	1,13093639
<i>smc01827</i>	Hypothetical protein	1,13072816
<i>smc01815</i>	Putative oxidoreductase iron-sulfur protein	1,13042916
<i>smb21003</i>	Putative oxidoreductase protein	1,12956842
<i>smc02885</i> ( <i>msrA1</i> )	Probable peptide methionine sulfoxide reductase protein	1,12080121
<i>smc01522</i>	Hypothetical protein	1,12002606
<i>smb20760</i> ( <i>phnH</i> )	Putative C-P (carbon-phosphorus) lyase component protein	1,11647086
<i>smc02278</i>	Hypothetical unknown transmembrane protein	1,11412845

<i>smc00338</i>	Conserved hypothetical protein	1,11325378
<i>smc01842</i>	Putative methyltransferase transcription regulator protein	1,11065826
<i>smb21221</i>	Putative sugar uptake ABC transporter periplasmic solute-binding protein precursor	1,06942932
<i>smb21186 (gabT)</i>	Putative 4-aminobutyrate aminotransferase protein	1,01874783
<i>smc02349 (asfA)</i>	Oxidoreductase protein	1,01855668
<i>smc03104 (hemA)</i>	Probable 5-aminolevulinic acid synthase (delta-aminolevulinic acid synthase) (delta-ala synthetase) protein	1,01671157

**Tabla A2.** Listado de genes obtenido del transcriptoma de Rm1021 en medio semisólido y en presencia de 2-TDC, que se encuentran menos expresados en presencia de esta metilcetona. Se indica el nombre del gen junto con una breve descripción y el valor M en orden decreciente.

Gen	Descripción	Valor de M
<i>smc02726 (shmR)</i>	Hemin-binding outer membrane receptor	-2,78123591
<i>sma2408 (rhbE)</i>	Rhizobactin siderophore biosynthesis protein	-2,39365543
<i>sma2400 (rhbA)</i>	Diaminobutyrate-pyruvate aminotransferase, rhizobactin siderophore biosynthesis protein	-2,31525513
<i>sma2402 (rhbB)</i>	1-2,4-diaminobutyrate decarboxylase, rhizobactin siderophore biosynthesis protein	-2,29662924
<i>sma2404 (rhbC)</i>	Rhizobactin siderophore biosynthesis protein	-2,20831536
<i>sma2337</i>	Putative transmembrane transport protein	-2,09059699
<i>sma2339</i>	Putative siderophore biosynthesis protein	-2,08888527
<i>sma2406 (rhbD)</i>	Rhizobactin siderophore biosynthesis protein	-1,99230901
<i>sma2410 (rhbF)</i>	Rhizobactin siderophore biosynthesis protein rhsf	-1,86348345
<i>smc01659</i>	Putative transport transmembrane protein	-1,77949212
<i>smc01513 (hmuS)</i>	Putative hemin transport protein	-1,67709246
<i>smc02867</i>	Putative multidrug-efflux system transmembrane protein	-1,63338037
<i>smc01517</i>	Conserved hypothetical protein	-1,6132362
<i>smc01514</i>	Conserved hypothetical protein	-1,61192051
<i>smb20010</i>	Hypothetical protein	-1,52217444
<i>sma2414 (rhtA)</i>	Rhizobactin receptor precursor	-1,47367763
<i>smc00784 (fbpA)</i>	Fe <sup>3+</sup> ABC transporter	-1,38782723
<i>smc02084 (exbD)</i>	Probable biopolymer transport transmembrane protein	-1,37305022
<i>smc01658</i>	Putative transport protein	-1,36044437
<i>smc01518</i>	Conserved hypothetical protein	-1,34080628
<i>smc02085 (exbB)</i>	Probable biopolymer transport transmembrane protein	-1,33486504
<i>smc01512 (hmuT)</i>	Putative hemin binding periplasmic transmembrane protein	-1,33445786
<i>smc01516</i>	Conserved hypothetical protein	-1,26489349
<i>sma1213 (fixp1)</i>	Di-heme cytochrome-C	-1,25160789
<i>sma1243 (azu1)</i>	Pseudoazurin (blue copper protein)	-1,20135831
<i>sma1182 (nosZ)</i>	Nitrous oxide reductase	-1,18550696
<i>smc00402</i>	Hypothetical signal peptide protein	-1,17401693
<i>smc00592</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,14608408
<i>smc01511</i>	Putative hemin transport system permease	-1,12136419

<i>(hmuU)</i>	transmembrane protein	
<i>sma0762 (fixk2)</i>	Transcription regulator	-1,09070215
<i>smc02577 (hslU)</i>	Probable heat shock protein	-1,06554883
<i>smb21432</i>	Putative iron uptake ABC transporter periplasmic solute-binding protein precursor	-1,05188275
<i>sma1147</i>	Conserved hypothetical protein	-1,05040637
<i>smc01510 (hmuV)</i>	Putative hemin transport system ATP-binding abc transporter protein	-1,03953709
<i>sma1225 (fixk1)</i>	Transcriptional activator	-1,03725696
<i>smb20139</i>	Hypothetical protein	-1,02877545
<i>smc03033</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,0150427
<i>sma2412 (rhra)</i>	Transcriptional activator	-1,01341701
<i>smb21431</i>	Hypothetical protein, possibly C-terminus of iron ABC transporter periplasmatic solute-binding protein	-1,0091144

# **DISCUSIÓN GENERAL**





**DISCUSIÓN GENERAL**

Las investigaciones realizadas en este trabajo de Tesis Doctoral han tenido como objetivo fundamental el adquirir mayor conocimiento sobre las bases moleculares que gobiernan la movilidad en superficie de la bacteria modelo *Sinorhizobium meliloti*, su posible conexión con la formación de biopelículas y el establecimiento de simbiosis con alfalfa. El interés de realizar este tipo de investigación radica en varios motivos. Por un lado, *S. meliloti* constituye un modelo dentro de la clase de las alfa-proteobacterias para el estudio de distintos aspectos de la movilidad bacteriana ya que difieren notablemente del paradigma de las enterobacterias (revisado en Scharf and Schmitt, 2002; Schmitt, 2002). Paradójicamente, el conocimiento existente sobre los distintos tipos de translocación que puede desarrollar en superficie esta bacteria y cuáles son los mecanismos que controlan su aparición, es muy escaso y en algunos casos las conclusiones obtenidas son contradictorias (Soto *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2005; Bahlawane *et al.*, 2008; Nogales *et al.*, 2010, 2012; Gao *et al.*, 2012). Por otro lado, este tipo de investigación puede proporcionar información sobre genes bacterianos, mecanismos reguladores, y señales que pueden ser importantes en las primeras etapas del establecimiento de simbiosis fijadora de N con plantas leguminosas. Nos referimos a etapas como la adsorción y la colonización que han sido muy poco investigadas en comparación con los procesos de nodulación y de fijación de N, y en las que fenotipos como la movilidad y la capacidad de formar biopelículas pueden ejercer una gran influencia. Se asume que los procesos de quimiotaxis y movilidad, aunque no son esenciales para la nodulación o la fijación de N, pueden facilitar el establecimiento de la simbiosis al dirigir a los rizobios hacia los sitios más adecuados para la infección de la planta hospedadora, influyendo en la eficiencia y capacidad competitiva por la formación de nódulos. No obstante, es importante destacar que la mayor parte de los estudios realizados con mutantes aflagelados, no móviles o no quimiotácticos de *S. meliloti* son estudios antiguos que se basan en la utilización de cepas no definidas genéticamente, por lo que las conclusiones obtenidas se deberían tomar con cautela (Ames and Bergman, 1981; Soby and Bergamn, 1983; Caetano-Anollés *et al.*, 1988). De forma similar, los estudios realizados hasta el momento sobre componentes de *S. meliloti* implicados en la formación de biopelículas, y el papel que éstas desempeñan en el establecimiento de la

interacción simbiótica es escaso (revisado en Rinaudi and Giordano 2010; Nogales *et al.*, 2013). Factores como la regulación por quorum sensing, exopolisacáridos (EPS I y EPS II), flagelos o el esqueleto oligosacárido del factor Nod se encuentran entre los componentes identificados que impactan la capacidad de *S. meliloti* para formar biopelículas. En numerosas bacterias la movilidad en general, y concretamente la movilidad *swarming*, está estrechamente relacionada con la formación de biopelículas bacterianas (Verstraeten *et al.*, 2008), y los primeros estudios realizados apuntan a que tal conexión también existe en nuestra bacteria de estudio (Amaya-Gómez, 2013).

En estudios anteriores a este trabajo se había constatado que *S. meliloti* es capaz de desplazarse sobre la superficie de medios semisólidos. Esta capacidad, sin embargo, parecía variar entre distintas cepas. Así, mientras las cepas Rm1021/Rm2011 mostraban con cierta frecuencia translocación en superficie de medio semisólido, la cepa GR4 nunca exhibió este tipo de movilidad (Soto *et al.*, 2002; Nogales *et al.*, 2010). Es necesario mencionar que ambas cepas presentan un gen *expR* no funcional, y por tanto no manifiestan el desplazamiento en superficie pasivo o *sliding* mediado por la producción del exopolisacárido galactoglucano (EPS II) que se ha descrito asociado a las cepas que producen el regulador transcripcional tipo LuxR del sistema quorum sensing ExpR/Sin de *S. meliloti* (Nogales *et al.*, 2012). Independientemente del fondo genético, GR4 o Rm1021, previo a este estudio se conocía que el gen *fadD* desempeña un papel clave en el control de la movilidad en superficie en *S. meliloti* ya que mutaciones por pérdida de función en este gen promueven dicha translocación (Soto *et al.*, 2002; Nogales *et al.*, 2010). FadD codifica una acil-CoA ligasa específica de ácidos grasos de cadena larga. La ausencia de esta actividad en *S. meliloti*, no sólo induce *swarming* sino que también altera expresión génica y afecta las características simbióticas de la bacteria (Soto *et al.*, 2002). El mecanismo mediante el cual la pérdida de función del gen *fadD* provoca estos fenotipos está aún por determinar.

Los resultados obtenidos en este trabajo han puesto de manifiesto la enorme complejidad del movimiento en superficie de *S. meliloti* y en la que se incluyen las grandes diferencias en los mecanismos de regulación mostradas por cepas de la misma especie. Además de genes directamente relacionados con movilidad, hemos identificado otra serie de genes con funciones diversas que también parecen tener una función en el control del movimiento en superficie

de *S. meliloti*. La caracterización en profundidad de algunos de ellos, nos ha permitido asignar una función a genes no caracterizados hasta el momento como *smc00525*, así como funciones adicionales a genes previamente descritos que no se habían relacionado con movilidad o formación de biopelículas (*exoX*). Un logro importante de este estudio, sin duda alguna, ha sido el identificar unas condiciones experimentales que permiten reproducir más fácilmente la movilidad en superficie de *S. meliloti* y que puede ser empleada con otros rizobios. Gracias a este logro, se han obtenido resultados que han abierto nuevas líneas de investigación como el control coordinado de expresión génica con el estado de ensamblaje del flagelo totalmente desconocido en rizobios, la participación de un nuevo gen en el control de la expresión de los genes *nod*, o el mecanismo de acción de 2-TDC como molécula señalizadora entre bacterias.

**Complejidad del movimiento en superficie de *S. meliloti*: grandes diferencias entre especies en los mecanismos de regulación.**

La existencia de diferencias en los mecanismos de control del movimiento en superficie entre las cepas GR4 y Rm1021 de *S. meliloti* ya se habían intuido en trabajos anteriores (Nogales *et al.*, 2010). En la aproximación genética descrita en el Capítulo 1 de este estudio, dichas diferencias volvieron a manifestarse, y se confirmaron por un lado, durante la caracterización más detallada de algunos de los genes identificados (Capítulo 2), pero sobre todo, tras analizar el comportamiento de derivados aflagelados en condiciones experimentales más permisivas para el desplazamiento en superficie (Capítulo3).

La aproximación genética adoptada en el capítulo 1 tenía como objetivo comprender el mecanismo por el cual la pérdida de función de *fadD* en *S. meliloti* promueve translocación en superficie en las cepas GR4 y Rm1021. Esta estrategia basada en el aislamiento y caracterización de transposantes derivados de los correspondientes mutantes *fadD* con un comportamiento en superficie distinto al de la cepa parental, puso en evidencia la existencia de distintos mecanismos responsables del movimiento en superficie en estos dos fondos genéticos. Por un lado, ninguno de los transposantes derivados de las dos cepas, resultó estar afectado en el mismo gen. Además, mientras en el caso de GR4*fadD* fue posible obtener transposantes totalmente defectivos en desplazamiento en superficie, en el caso de 1021*fadD* todos los mutantes

derivados presentaron cierto grado de translocación aunque fuese de menor cuantía que la cepa Rm1021. Hoy sabemos que a diferencia de GR4 y su mutante *fadD*, Rm1021 y 1021FDCSS producen el sideróforo rizobactina 1021 (Rhb1021) que con su actividad surfactante facilita el desplazamiento en superficie de estas cepas participando tanto en mecanismos dependientes como independientes de flagelos (Nogales *et al.*, 2010, 2012). Que no se hayan identificado transposantes derivados de 1021FDCSS afectados en genes esenciales en la producción del sideróforo (*rhb* o *rhrA*) tiene su explicación en el hecho demostrado de que una mutación *fadD* anula el defecto en translocación de mutantes defectivos en la síntesis del sideróforo (Nogales *et al.*, 2010).

Lo que en un principio pudo parecernos un gran obstáculo al desarrollo de nuestras investigaciones, la imposibilidad de reproducir movilidad en superficie utilizando el protocolo habitual con agar purificado marca Pronadisa, aceleró la identificación del agar Noble Difco (AN) como un agente gelificante que proporciona condiciones más permisivas y reproducibles para la observación y estudio de este tipo de translocación, tanto en *S. meliloti* como en otros rizobios. El empleo de AN junto con la obtención de distintos derivados aflagelados de las cepas GR4 y Rm1021, nos ha permitido caracterizar el movimiento mostrado por estas cepas así como la de sus derivados *fadD*, al mismo tiempo que nos ha permitido poner de manifiesto fenómenos hasta ahora desconocidos en *S. meliloti*. Los resultados obtenidos claramente demuestran que el tipo de translocación en superficie empleado por GR4 y Rm1021 es completamente distinto. El modo de translocación que utiliza GR4 es *swarming* ya que es absolutamente dependiente de flagelos, como lo demuestra el comportamiento inmóvil sobre superficie de un derivado *flaAB* incapaz de sintetizar filamentos flagelares. A diferencia de GR4, Rm1021 se desplaza en superficie utilizando mayoritariamente un tipo de translocación que es independiente de acción flagelar ya que el derivado *flaAB* coloniza la superficie casi tan eficientemente como la cepa flagelada. En el mecanismo que media en el desplazamiento en ausencia de flagelos, la producción del sideróforo Rhb1021, producido por Rm1021 pero no por GR4, desempeña un papel fundamental como así lo revela el comportamiento de un mutante *rhbD*. Aunque la importancia de Rhb1021 en el desplazamiento en superficie de Rm1021 ya se había constatado en trabajos anteriores del grupo utilizando

agar Pronadisa (Nogales *et al.*, 2010, 2012; Amaya-Gómez, 2013), aquí demostramos que su síntesis sin embargo, no es esencial en la movilidad de Rm1021 ya que un mutante defectivo en la producción del sideróforo aún sigue presentando cierta capacidad de desplazamiento. La existencia en Rm1021 de un movimiento en superficie independiente de acción flagelar mediado por Rhb1021, nos lleva a proponer la cepa GR4 de *S. meliloti* como la cepa preferible para realizar investigaciones sobre movilidad *swarming* ya que en ésta no existen interferencias con otros mecanismos de desplazamiento independientes de acción flagelar.

Mediante la construcción de los correspondientes mutantes aflagelados también hemos podido caracterizar el movimiento en superficie mostrado por mutantes *fadD* de *S. meliloti*. Una vez más, el efecto que ocasiona la mutación sobre el desplazamiento en superficie en *S. meliloti* es distinto dependiendo del fondo genético en que se analice. En GR4, la pérdida de función del gen *fadD* incrementa el desplazamiento en superficie tal y como hasta ahora se había descrito (Soto *et al.*, 2002; Nogales *et al.*, 2010). Aquí además, demostramos que dicho incremento se debe fundamentalmente a la estimulación de un movimiento independiente de flagelos. A diferencia de GR4, la ausencia de un *fadD* funcional en Rm1021 no estimula la translocación bacteriana en superficie, y sorprendentemente, la mutación *fadD* interfiere negativamente con el movimiento independiente de flagelos mostrado por la cepa 1021flaAB (efecto contrario al observado en GR4), mediante un mecanismo aún desconocido. En la búsqueda de un modelo, ayudaría mucho conocer el factor que promueve el desplazamiento en superficie independiente de flagelos típico de 1021flaAB, del que podemos decir que al menos no es Rhb1021.

### **Nuevos determinantes genéticos implicados en la movilidad en superficie de *S. meliloti*.**

La caracterización de los transposantes aislados en el Capítulo 1 ha permitido comprobar que en el desplazamiento en superficie mostrado por mutantes *fadD* de *S. meliloti*, no sólo participan genes directamente relacionados con movilidad, sino otros genes con funciones variadas entre los que se encuentran genes de respuesta a estreses ambientales, reguladores que afectan la producción de exopolisácaridos, y genes de función hasta ahora desconocida. La implicación en la movilidad *swarming* de genes que participan en funciones celulares adicionales a las de movilidad es un hecho que ha sido

constatado en otras bacterias como *S. enterica*, *E. coli* y *P. aeruginosa* donde entre otros, se han identificado genes implicados en metabolismo, secreción, adquisición de hierro, síntesis de componentes de la superficie celular, reguladores etc, (Inoue *et al.*, 2007; Kim and Surette, 2004; Overhage *et al.*, 2007). La mayoría de los genes identificados en este estudio participan en movilidad general afectando tanto movilidad en superficie como movilidad *swimming*. No obstante, ha sido posible identificar 2 genes (*exoX* y *smc00525*) con función específica en el desplazamiento en superficie de *S. meliloti*.

La participación de una movilidad *swarming* en el desplazamiento en superficie mostrado por los mutantes *fadD* de *S. meliloti* se puso en evidencia con el aislamiento de un alto porcentaje de mutantes aflagelados (9/14) y 1 mutante *mot* en los que la ausencia o inactividad del flagelo también provocaba defectos en movilidad tipo *swimming*. Todos los mutantes de este grupo, a excepción del mutante *emmA*, se encontraban afectados en genes del regulón flagelar. EmmA, una proteína pequeña periplásmica que actúa conjuntamente con el sistema regulador de dos componentes EmmBC, ya había sido descrita en la literatura como proteína que participa en el control coordinado de genes flagelares y EPS (Morris and González 2009), por lo que no es de extrañar su participación en la movilidad *swarming*. Por otro lado, la identificación de un mutante afectado en el gen *cheA* entre los transposantes derivados de cepas *fadD* de *S. meliloti* que mostraban una movilidad en superficie distinta de la de su cepa parental, ha permitido demostrar que a diferencia de enterobacterias, la histidín quinasa CheA del sistema de quimiotaxis, que es requerida para una eficiente movilidad *swimming*, no es esencial en el movimiento en superficie de *S. meliloti*. Quizás la distinta contribución del sistema de quimiotaxis al *swarming* de enterobacterias y *S. meliloti* se deba al distinto modo de funcionamiento de los flagelos en estas bacterias. La capacidad de revertir el sentido de rotación de los flagelos en enterobacterias (anulada en mutantes *che*) podría contribuir al *swarming* al ayudar a despegar los flagelos que pudieran quedar atrapados en un medio viscoso y a generar la suficiente humedad como para desplazarse en superficie (Mariconda *et al.*, 2006). En *S. meliloti*, donde los flagelos sólo pueden rotar en el sentido de las agujas del reloj, la máxima velocidad de rotación que muestran los flagelos de mutantes *cheA* (Sourjik and Schmitt 1996), podría facilitar su desplazamiento en superficie, mejorándolo incluso con respecto a

la cepa silvestre, en situaciones más restrictivas para este tipo de movilidad. No podemos descartar, no obstante, que en *S. meliloti* existan determinadas señales o moléculas que sean capaces de fosforilar al regulador de respuesta CheY2, de una forma totalmente independiente de CheA como ocurre en *Salmonella* (Da Re *et al.*, 1999), haciéndolo únicamente en condiciones inductoras de translocación en superficie y no durante el *swimming*.

La verdadera participación de *sodB* (*sodA*) que codifica la única superóxido dismutasa (SOD) citoplasmática de *S. meliloti* (Santos *et al.*, 1999) en el desplazamiento en superficie de nuestra bacteria de estudio, aún queda pendiente de esclarecer. Es difícil explicar cómo una mutación que teóricamente conlleva la producción de una SOD a la que le faltarían sólo los 6-7 aminoácidos del C-terminal, puede dar lugar a un defecto en movilidad general. No obstante, lo más sorprendente y lo que nos obliga a tomar con precaución la participación de este gen en movilidad, es que el mutante *sodB* aislado en este estudio es capaz de nodular y fijar N en plantas de alfalfa y sólo presenta un defecto en competitividad, lo que contrasta con el fenotipo simbiótico que ha sido publicado para un mutante en el mismo gen que se encuentra severamente afectado en todas las etapas de la simbiosis: infección, nodulación, diferenciación a bacteroides y fijación de N (Santos *et al.*, 2000). Aunque las diferencias obtenidas podrían ser explicables al tratarse de fondos genéticos distintos (nuestro mutante *sodB* se obtuvo en una cepa deficiente en *fadD*), es necesario realizar una investigación más exhaustiva de la posible implicación de este gen o regiones de ADN adyacentes en el control de la movilidad en superficie de *S. meliloti*.

La identificación y caracterización de dos genes que participan específicamente en la translocación en superficie de mutantes *fadD* de *S. meliloti*, ha permitido asignar nuevas funciones a los genes *exoX* y *smc00525*. ExoX se había descrito como un regulador que afecta negativamente la cantidad de EPS I mediante un mecanismo posttraduccional en el que la estequiometría con ExoY es importante (Reed *et al.*, 1991). En este estudio, hemos demostrado que el gen *exoX*, independientemente del fondo genético de *S. meliloti*, afecta a la cantidad de succinoglucano (EPS I) producido y a la capacidad de formar biopelículas sobre superficies abióticas, estando ambos fenotipos relacionados. Por el contrario el efecto de *exoX* en translocación en superficie es distinto dependiendo de la cepa de *S. meliloti*: mientras en GR4 *exoX* no influye en

motilidad, la superproducción de EPS I causada por la delección del gen *exoX* en Rm1021 incrementa la translocación en superficie promoviendo tanto *swarming* como movilidad independiente de flagelos. La producción de niveles normales de EPS I sin embargo, no es esencial en el desplazamiento en superficie de Rm1021. El incremento en los niveles de EPS I podría facilitar la translocación en superficie de Rm1021 funcionando como un surfactante que disminuye las fuerzas de fricción y de tensión superficial, o incluso actuando como osmolito que consigue extraer del agar subyacente el agar suficiente para el correcto funcionamiento de los flagelos de manera análoga a como se ha descrito para el polisacárido ácido Cmf (*Colony Migration Factor*) producido por *P. mirabilis* (Gygi et al., 1995b; Verstraeten et al., 2008; Partridge and Harshey, 2013b). Desconocemos la razón por la cual los mutantes *exoX* derivados de las cepas GR4 y GR4fadD, que también producen mayor cantidad de EPS I, no muestran mayor translocación en superficie. Una posibilidad es que el control de la síntesis de EPS I (en cantidad, calidad, grado de polimerización...etc.) sea distinto entre las cepas GR4 y Rm1021, y que esas diferencias sean importantes en la función que el EPS I pueda tener en movilidad. Otras posibilidades no excluyentes son que la mayor producción de EPS I incremente el efecto de otros componentes con función en translocación superficial que se encuentren presentes en Rm1021 pero no en GR4, como es el caso del sideróforo Rhb1021 (Nogales et al., 2010).

El gen *smc00525* codifica una proteína transmembrana de gran tamaño de función hasta ahora desconocida y que parece estar muy conservada en otros rizobios. La presencia en el extremo N-terminal de la proteína de un sitio de unión a ATP típico de proteínas quinasas sugiere que podría funcionar en un proceso de señalización modulando la actividad de otras proteínas mediante fosforilación. Hemos comprobado que este gen participa en el control de la movilidad en superficie tanto en Rm1021 como en GR4, aunque con distinto efecto. Mientras en Rm1021 y 1021fadD favorece la translocación en superficie, Smc00525 promueve la movilidad *swarming* de GR4 pero interfiere negativamente con el movimiento independiente de flagelos mostrado por GR4fadD. Smc00525 además afecta la capacidad de formar biopelículas y a las propiedades simbióticas de la bacteria en GR4 pero no en Rm1021. El análisis transcriptómico de un mutante delecionado en este gen no nos ha dado una respuesta clara sobre la función que desempeña, aunque sí ha



puesto de manifiesto importantes diferencias, algunas de las cuales podrían ser las responsables del distinto comportamiento simbiótico de la cepa delecionada en *smc00525*. Así, se detectó la inducción de transposasas pertenecientes a distintas secuencias de inserción presentes en el genoma de *S. meliloti*, la represión de numerosos genes relacionados con el metabolismo y captación de hierro, entre ellos, los implicados en la síntesis y captación del sideróforo Rhb1021, y la expresión diferencial de genes *nod*. La activación de la expresión de los elementos genéticos móviles podría ser el resultado de una situación de estrés extrema provocada por la doble mutación *fadD* y *smc00525*, a la que intenta adaptarse mediante fenómenos de reordenación genómica, hecho que no hemos comprobado. Es llamativa la represión en el doble mutante de los genes implicados en la síntesis y captación del sideróforo Rhb1021, ya que estos genes se encontraron inducidos en la cepa 1021fadD en respuesta al crecimiento en condiciones inductoras de movilidad en superficie, y curiosamente ni GR4 ni GR4fadD son capaces de producir Rhb1021 en ninguna de las condiciones hasta ahora ensayadas, a pesar de tener los genes requeridos para ello. Quizás el control de la expresión de los genes para la síntesis de este sideróforo, en el que Smc00525 quizás tiene alguna función, sea otra de las numerosas diferencias existentes entre GR4 y Rm1021. Por último, el análisis transcriptómico nos ha permitido demostrar que *smc00525* influye en los niveles de expresión del gen *nodC* en respuesta a luteolina, pero sólo en las cepas GR4 y GR4fadD. Si la distinta regulación de genes *nod* comunes y específicos observada en el análisis puede dar lugar a factores Nod con distinta estructura que pudieran afectar al establecimiento de la simbiosis, queda pendiente de una investigación futura.

### **Efecto del estado de ensamblaje del flagelo sobre la movilidad en superficie de *S. meliloti***

El empleo de distintos mutantes aflagelados en nuestro estudio, nos ha permitido constatar que el estado de ensamblaje del flagelo parece repercutir en el desplazamiento en superficie de las cepas de *S. meliloti*, aunque también en este caso con efectos distintos dependiendo de la cepa. Así, en GR4, el mutante aflagelado *flgK* es capaz de desarrollar cierta movilidad en superficie contrastando con el comportamiento totalmente inmóvil del mutante *flaAB*. Por el contrario, un mutante aflagelado *flgE* de Rm1021 se encuentra

severamente afectado en desplazamiento en superficie, contrastando con el gran desplazamiento mostrado por el derivado *flaAB* de esta cepa. Los mutantes *flgK* y *flgE* se encuentran afectados en una etapa del ensamblaje del flagelo anterior a la de los mutantes *flaAB* incapaces de sintetizar las flagelinas. El distinto comportamiento mostrado por mutantes incapaces de completar el HBB del flagelo (*flgK* o *flgE*) y los que simplemente carecen de filamento flagelar (*flaAB*), sugiere la existencia de factores que participando en el movimiento en superficie se encuentran regulados de manera coordinada con el estado del ensamblaje del flagelo. Se trataría de un fenómeno similar al que ha sido descrito para la regulación de la síntesis del surfactante HAA de *P. syringae* pv. *syringae* donde mutaciones en genes necesarios para las etapas tempranas del ensamblaje abolen o reducen la producción de HAA, mientras que mutaciones en genes de la flagelina o que participan en glicosilación de la flagelina incrementan la producción de este surfactante (Burch *et al.*, 2012). Según nuestro conocimiento, ésta es la primera vez que se evidencia la existencia de mecanismos de regulación co-ordinados con el estado de ensamblaje del flagelo en un *Rhizobium*, abriendo así la puerta a nuevas líneas de investigación. Este mecanismo regulador también afecta al comportamiento de mutantes *fadD* derivados de GR4, donde el desplazamiento independiente de flagelos promovido por la mutación *fadD*, se ve ligeramente reducido si no se completa el HBB. En Rm1021 por el contrario, la incapacidad de ensamblar el HBB, anula cualquier efecto producido por la mutación *fadD*. Basándonos en los datos obtenidos con la cepa GR4, hemos propuesto una hipótesis de trabajo que se representa en la figura 20 del Capítulo III. En Rm1021, la interferencia causada por la Rhb1021 y el desconocimiento exacto de cómo ocurre su síntesis, complica aún más la elaboración de un modelo. Según nuestro modelo, mutaciones que afectan a etapas tempranas del ensamblaje del flagelo provocan la acumulación de una proteína reguladora que activaría un mecanismo de translocación en superficie al que denominamos FIT1: desplazamiento en superficie independiente de flagelos (FIT, *Flagella-Independent Translocation*), que podría estar mediado por ej. por un surfactante. En la situación del mutante *flaAB*, donde se ha completado el HBB, la proteína reguladora es secretada al medio externo, por lo que su concentración intracelular es insuficiente para activar el mecanismo FIT1 a un nivel que permita el desplazamiento de un mutante aflagelado GR4*flaAB*. En el mutante *flgK*, el bloqueo en la secreción de la proteína reguladora provoca el

incremento en su concentración intracelular, activándose notablemente el mecanismo FIT1, lo que permite cierto desplazamiento en superficie de GR4flgK. La mutación *fadD* genera la acumulación del compuesto “Y” que estimula significativamente un mecanismo de translocación independiente de flagelos, FIT2, y que es responsable de la gran translocación mostrada por GR4fadDflaAB, casi idéntica a la desarrollada por GR4fadD. El compuesto “Y” puede encontrarse en un fondo *fadD*<sup>+</sup>, pero en concentraciones muy inferiores, por lo que el mecanismo FIT2 es insuficiente para permitir la translocación en superficie de un GR4flaAB. Para explicar el comportamiento del doble mutante GR4fadDflgk proponemos que la proteína reguladora, cuya secreción por el T3SS del flagelo se ve impedida en el mutante *flgK*, actúa como represor del mecanismo inducido por “Y” y que lleva a FIT2. No obstante la actividad represora sería insuficiente, permitiendo cierta manifestación del mecanismo FIT2, lo que explica el mayor desplazamiento mostrado por el mutante GR4fadDflgk comparado con el de GR4flgk. Aunque con los datos de que disponemos es difícil elaborar una hipótesis sobre cómo encajaría SMC00525 en este modelo nos aventuramos a sugerir que esta proteína controla la puesta en marcha de FIT2 actuando a dos niveles: en presencia de un HBB ensamblado SMC00525 reprime la puesta en marcha de FIT2, mientras que en un mutante *flgK*, SMC00525 interfiere con la actividad represora sobre FIT2 de la proteína reguladora, permitiendo que se manifieste este mecanismo de translocación en superficie. Esto explicaría por qué la mutación *smc00525* y la adición de 2-TDC tienen el mismo efecto sobre genes relacionados con captación de hierro.

La naturaleza del factor o factores que impactan el movimiento en superficie de GR4 y que participarían en los mecanismos FIT, así como las bases moleculares que rigen su control de manera coordinada con el ensamblaje del flagelo son líneas de investigación futuras del grupo en el que se ha realizado esta Tesis doctoral.

### **Influencia de 2-TDC en la movilidad en superficie de *S. meliloti***

La metilcetona 2-TDC se identificó como un compuesto que se acumula en mutantes *fadD* de *S. meliloti*. Su aplicación a medios de cultivo induce movilidad en superficie en distintas bacterias incluyendo cepas de *S. meliloti*. Interesantemente, estudios realizados en el grupo, han demostrado que la

aplicación de esta metilcetona limita la capacidad infectiva de bacterias que interaccionan con plantas, retrasando y reduciendo el número de nódulos desarrollados en alfalfa en respuesta a la inoculación con *S. meliloti*, y reduciendo la sintomatología de la peca bacteriana en tomate causada por *P. syringae* pv. tomato (Soto *et al.*, en preparación; patente ref. PCT/ES2013/070570). Por el momento, aún se desconoce si estos efectos son consecuencia de haber alterado el comportamiento en superficie de la bacteria o si pudieran existir otros mecanismos implicados por ej., actuando a través de la planta.

En este estudio hemos comprobado que el efecto ejercido por la 2-TDC en *S. meliloti* es específico de la movilidad en superficie (no afecta la movilidad *swimming*) y dependiente de dosis. Tanto en GR4 como Rm1021, la 2-TDC promueve la movilidad en superficie estimulando tanto *swarming* como movimiento independiente de flagelos. El modo en que este compuesto tiene efecto sobre el comportamiento en superficie de diversas bacterias (actúa como volátil, en concentraciones del orden micromolar y no afecta el crecimiento bacteriano), nos hace pensar que la 2-TDC pudiera funcionar como molécula señal, hipótesis en la que se trabaja actualmente en el grupo. Moléculas de estructura parecida como los ácidos grasos insaturados de la familia DSF o  $\alpha$ -hidroxicetonas como las de la familia CAI-1 tienen un papel en comunicación intercelular (Winans, 2011). En un primer intento por demostrar esta hipótesis, al mismo tiempo que identificar el mecanismo por el que la 2-TDC promueve desplazamiento en superficie, en este trabajo se ha realizado un análisis transcriptómico de Rm1021 en respuesta a la metilcetona. Curiosamente, el efecto a nivel de expresión génica ejercido por 2-TDC es distinto dependiendo de que las células se encuentren creciendo en medio líquido o sobre una superficie, no detectándose cambios en cultivos líquidos, lo que parece indicar que este compuesto requiere de la fisiología particular de células crecidas en una superficie (Nogales *et al.*, 2010). Desafortunadamente, ha sido escasa la información obtenida de este análisis donde sólo cabe destacar la activación de genes que indican la generación de un posible estrés en la célula, la represión de genes relacionados con el metabolismo y captación de Fe, y la ausencia de genes flagelares entre los genes que se activan transcripcionalmente en presencia de 2-TDC. No es posible descartar que el efecto causado por este compuesto tenga lugar a través de mecanismos

postranscripcionales que no pueden ser detectados con esta estrategia. La obtención y caracterización de mutantes de *S. meliloti* incapaces de mostrar movilidad en superficie en respuesta a 2-TDC podría potencialmente dar las claves del mecanismo de acción de esta metilcetona.

### **Conexión con formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis con plantas de alfalfa**

Han sido pocos los resultados obtenidos en este estudio para poder establecer una conexión entre movilidad en superficie y la capacidad de formación de biopelículas en *S. meliloti*. De los dos genes analizados en profundidad y con los que se ha investigado esta posible conexión, sólo el gen *exoX* se ha podido relacionar con formación de biopelículas en los distintos fondos analizados, fenotipo que está ligado a la capacidad de regular los niveles de EPS I. Sin embargo, aunque en todas las cepas la mutación *exoX* incrementó los niveles de EPS I y la capacidad de formar biopelículas, no en todos alteró la movilidad en superficie. De igual forma, aunque *Smc00525* participa en el control de la movilidad de las distintas cepas estudiadas, sólo se ha detectado alteración en formación de biopelículas en PVC en una de ellas. Es necesario mencionar que *S. meliloti* es muy mal formador de biopelículas en PVC en comparación con otras bacterias y quizás esto dificulte la identificación de factores que influyen en este comportamiento bacteriano. Recientemente, se ha comprobado que la formación de biofilms de *S. meliloti* sobre superficie de vidrio refleja mejor el comportamiento de las bacterias durante la colonización de la raíz, que el comportamiento sobre superficie de PVC (Amaya-Gómez 2013). El desarrollo de un método que permita el análisis de biopelículas de *S. meliloti* en condiciones menos artificiales, junto con la identificación de mayor número de mutantes alterados en translocación en superficie, podrá permitir conocer si al igual que en otras bacterias en *S. meliloti* existe una clara conexión entre los dos fenotipos asociados a superficie.

Con respecto al impacto que la movilidad en superficie puede tener en el establecimiento de simbiosis con alfalfa, los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que ninguno de los genes que participan en este fenotipo es esencial para la nodulación o la fijación de nitrógeno. No obstante, algunos de ellos sí han tenido un impacto sobre la infectividad y/o competitividad por la nodulación. A pesar de que estudios previos relacionan la ausencia de

flagelos y movilidad con un retraso en el proceso de nodulación (Fujishige *et al.*, 2006), nuestros resultados no permiten establecer una correlación obvia entre estos dos fenotipos. Así de los 8 mutantes aflagelados identificados, sólo 4 presentaron algún defecto en infectividad o competitividad. No obstante, es importante recordar que los mutantes aquí caracterizados se han obtenido sobre fondos mutantes *fadD*, y están afectados en genes que pertenecen a distintas clases del regulón flagelar. Teniendo en cuenta el efecto que el estado del ensamblaje del flagelo puede tener sobre el desplazamiento en superficie, mutantes aflagelados podrían tener distinto comportamiento. Tampoco es posible establecer una correlación entre mayor desplazamiento en superficie y algún efecto en el establecimiento de simbiosis. De dos genes que causan hipermovilidad en superficie (*exoX* y *smc00525*), sólo *smc00525* genera defectos en competitividad e infectividad. Con la identificación en este trabajo de distintos mecanismos de desplazamiento en superficie, sería interesante investigar la participación de cada uno de ellos en la simbiosis, utilizando condiciones en las que estos mecanismos puedan ser relevantes, distintas del cultivo hidropónico aquí utilizado.

No obstante, la identificación de *smc00525* como gen que afecta las propiedades simbióticas de *S. meliloti*, y de la 2-TDC como compuesto que altera el comportamiento en superficie de las bacterias y limita la infección bacteriana, corrobora la validez de la estrategia basada en la caracterización de las bases moleculares que gobiernan la movilidad en superficie de *S. meliloti*, para identificar genes y señales con funciones importantes en las interacciones planta-bacteria.

# **CONCLUSIONES**





1. La aproximación genética adoptada en este estudio para la identificación de componentes implicados en el desplazamiento en superficie mostrado por mutantes *fadD* de *S. meliloti*, ha puesto de manifiesto la participación de genes adicionales a aquéllos esenciales en la síntesis, ensamblaje y funcionamiento del flagelo, y entre los que se encuentran genes de respuesta a estreses ambientales, reguladores que afectan la producción de exopolisacáridos, y un gen de función hasta ahora desconocida. De los 14 genes identificados, sólo dos (*exoX* y *smc00525*) afectan específicamente la translocación en superficie de mutantes *fadD* de *S. meliloti*.
2. A diferencia de enterobacterias, la histidín quinasa CheA del sistema de quimiotaxis no es esencial en el movimiento en superficie de *S. meliloti*.
3. El gen *exoX*, independientemente del fondo genético de *S. meliloti*, afecta a la cantidad de succinoglucano (EPS I) producido y a la capacidad de formar biopelículas sobre superficies abióticas, estando ambos fenotipos relacionados. Por el contrario el efecto de *exoX* en translocación en superficie es distinto dependiendo de la cepa de *S. meliloti*: mientras en GR4 *exoX* no influye en motilidad, la superproducción de EPS I causada por la delección del gen *exoX* en Rm1021 incrementa la translocación en superficie promoviendo tanto *swarming* como movilidad independiente de flagelos. La producción de niveles normales de EPS I sin embargo, no es esencial en el desplazamiento en superficie de Rm1021.
4. La utilización de agar Noble proporciona condiciones más permisivas y reproducibles para la observación y análisis detallado de movilidad en superficie en *S. meliloti* que otros tipos de agar como el purificado de la casa comercial Pronadisa, previamente utilizado en estos estudios. Estas mismas condiciones pueden ser utilizadas para estudiar el comportamiento en superficie de otros rizobios como: *R. etli*, *R. leguminosarum* o *S. fredii*.
5. Las cepas GR4 y Rm1021 se desplazan en superficie utilizando mecanismos completamente distintos. El tipo de translocación mostrado por la cepa GR4 en superficie de MM semisólido es *swarming* ya que es absolutamente dependiente de acción flagelar. En esta cepa, la incapacidad de completar el HBB del flagelo estimula un desplazamiento en superficie a través de un

mecanismo aún no identificado. A diferencia de GR4, la cepa Rm1021 que muestra mayor capacidad de dispersión en superficie, se desplaza utilizando mayoritariamente un movimiento independiente de flagelos en el que la producción del sideróforo Rhb1021 desempeña un papel importante aunque no esencial, y que se ve abolido en ausencia de gancho flagelar.

6. El efecto que la mutación *fadD* ejerce sobre la movilidad en superficie de *S. meliloti* es altamente dependiente del fondo genético. La ausencia de un gen *fadD* funcional en GR4 incrementa el desplazamiento en superficie de esta bacteria promoviendo un movimiento independiente de flagelos cuya plena manifestación requiere la presencia de un HBB completo. A diferencia de lo observado para GR4, una mutación *fadD* no incrementa la movilidad en superficie de Rm1021 al interferir drásticamente con el movimiento mayoritario independiente de flagelos característico de esta cepa. En Rm1021, pero no en GR4, mutaciones que abortan el ensamblaje del flagelo en etapas tempranas son epistáticas sobre la mutación *fadD*.

7. El gen *smc00525* que potencialmente codifica una proteína transmembrana de gran tamaño y de función hasta ahora desconocida, participa en el control de la movilidad en superficie tanto en Rm1021 como en GR4 aunque con efectos opuestos en mutantes *fadD* de estas cepas. Específicamente en el fondo genético de GR4, *smc00525* contribuye a favorecer la movilidad *swarming* y el movimiento independiente de flagelos de mutantes *flgK*, pero por el contrario, interfiere ligeramente con el desplazamiento independiente de flagelos de mutantes *fadD*. En GR4 pero no en Rm1021, este gen además afecta la capacidad de formar biopelículas, así como las características simbióticas de la bacteria, destacando su participación en el control de los niveles de expresión de genes *nod* comunes y capacidad competitiva por la ocupación de nódulos.

8. La 2-tridecanona (2-TDC), una metilcetona identificada asociada a un mutante *fadD*, promueve de manera específica la movilidad en superficie de las cepas GR4 y Rm1021 de *S. meliloti* estimulando tanto el movimiento dependiente como el independiente de flagelos. En GR4, la 2-TDC no tiene

efecto aditivo en la estimulación del movimiento independiente de flagelos que genera una mutación *fadD*.

9. El análisis transcriptómico de Rm1021 en respuesta a 2-TDC no ha permitido descifrar aún el mecanismo molecular por el que esta metilcetona promueve movilidad en superficie en *S. meliloti*. No obstante, se ha comprobado que el efecto causado por la 2-TDC en expresión génica de Rm1021 es distinto dependiendo de si las células crecen en medio líquido o sobre una superficie. Sólo en células crecidas sobre superficie semisólida, la aplicación de 2-TDC ha provocado alteraciones significativas en la expresión génica, destacando la inducción de genes relacionados con resistencia a estreses, y la represión de genes previamente relacionados con la translocación en superficie de Rm1021 y que incluye los implicados en regulación, síntesis y transporte del sideróforo Rhb1021.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- Alavi, M., and Belas, R. (2001). Surface sensing, swarmer cell differentiation, and biofilm development. *Methods in enzymology* 336, 29-40.
- Allison, C., Emody, L., Coleman, N., and Hughes, C. (1994). The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. *The Journal of infectious diseases* 169, 1155-1158.
- Allison, C., Lai, H.C., Gygi, D., and Hughes, C. (1993). Cell differentiation of *Proteus mirabilis* is initiated by glutamine, a specific chemoattractant for swarming cells. *Molecular microbiology* 8, 53-60.
- Allison, C., Lai, H.C., and Hughes, C. (1992). Co-ordinate expression of virulence genes during swarm-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Molecular microbiology* 6, 1583-1591.
- Amaya-Gómez, C.V. (2009). Identificación de determinantes genéticos del *swarming* en *Sinorhizobium meliloti*. Trabajo de Investigación Tutelada, Universidad de Granada.
- Amaya-Gómez, C.V. (2013). Transcriptomic approach for the identification of genes and signals palyng a role in swarming motility of *Sinorhizobium meliloti*: connection with biofilm formation and symbiosis. Tesis Doctoral, Universidad de Granada
- Ames, P., and Bergman, K. (1981). Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 148, 728-908 p.
- Anderson, J.K., Smith, T.G., and Hoover, T.R. (2010). Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends in microbiology* 18, 30-37.
- Antonious, G.F. (2013). 2-undecanone and 2-tridecanone in field-grown onion. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* 48, 302-307.
- Antonious, G.F., Dahlman, D.L., and Hawkins, L.M. (2003). Insecticidal and acaricidal performance of methyl ketones in wild tomato leaves. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 71, 400-407.
- Attmannspacher, U., Scharf, B., and Schmitt, R. (2005). Control of speed modulation (chemokinesis) in the unidirectional rotary motor of *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular microbiology* 56, 708-718.
- Bahlawane, C., McIntosh, M., Krol, E., and Becker, A. (2008). *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Molecular plant-microbe interactions* 21, 1498-1509.
- Banin, E., Vasil, M.L., and Greenberg, E.P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 11076-11081.
- Barber, C.E., Tang, J.L., Feng, J.X., Pan, M.Q., Wilson, T.J., Slater, H., Dow, J.M., Williams, P., and Daniels, M.J. (1997). A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Molecular microbiology* 24, 555-566.
- Bardin, S., Dan, S., Osteras, M., and Finan, T.M. (1996). A phosphate transport system is required for symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 178, 4540-4547.
- Barnett, M.J., Fisher, R.F., Jones, T., Komp, C., Abola, A.P., Barloy-Hubler, F., Bowser, L., Capela, D., Galibert, F., Gouzy, J., *et al.* (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98, 9883-9888.

Becker, A., Berges, H., Krol, E., Bruand, C., Ruberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., de Bruijn, F.J., *et al.* (2004). Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Molecular plant-microbe interactions* 17, 292-303.

Belanger, L., Dimmick, K.A., Fleming, J.S., and Charles, T.C. (2009). Null mutations in *Sinorhizobium meliloti* *exoS* and *chvI* demonstrate the importance of this two-component regulatory system for symbiosis. *Molecular microbiology* 74, 1223-1237.

Beringer, J.E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium Leguminosarum* *Journal of general microbiology* 84, 188-198.

Blom, D., Fabbri, C., Connor, E.C., Schiestl, F.P., Klauser, D.R., Boller, T., Eberl, L., and Weisskopf, L. (2011). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environmental microbiology* 13, 3047-3058.

Borthakur, D., and Johnston, A.W. (1987). Sequence of *psi*, a gene on the symbiotic plasmid of *Rhizobium phaseoli* which inhibits exopolysaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by *psr*, another gene on the symbiotic plasmid. *Molecular and general genetics* 207, 149-154.

Braeken, K., Daniels, R., Vos, K., Fauvart, M., Bachaspatimayum, D., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2008). Genetic determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microbial ecology* 55, 54-64.

Brewin, N.J. (2004). Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium–Legume Symbiosis. *Critical reviews in plant sciences* 23, 293-216.

Burch, A.Y., Shimada, B.K., Mullin, S.W., Dunlap, C.A., Bowman, M.J., and Lindow, S.E. (2012). *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *Journal of bacteriology* 194, 1287-1298.

Burkart, M., Toguchi, A., and Harshey, R.M. (1998). The chemotaxis system, but not chemotaxis, is essential for swarming motility in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 2568-2573.

Caetano-Anollés, G., Crist-Estes, D.K., and Bauer, W.D. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *Journal of bacteriology* 170, 3164-3169.

Caiazza, N.C., Shanks, R.M., and O'Toole, G.A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 187, 7351-7361.

Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., Boistard, P., Becker, A., Boutry, M., Cadieu, E., *et al.* (2001). Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9877-9882.

Casadesús, J., and Olivares, J. (1979). Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Molecular and general genetics* 174, 203-209.

Covelli, J.M., Althabegoiti, M.J., López, M.F., and Lodeiro, A.R. (2013). Swarming motility in *Bradyrhizobium japonicum*. *Research in microbiology* 164, 136-144.

Cuiv, P.O., Keogh, D., Clarke, P., and O'Connell, M. (2008). The *hmuUV* genes of *Sinorhizobium meliloti* 2011 encode the permease and ATPase components of an ABC



transport system for the utilization of both haem and the hydroxamate siderophores, ferrichrome and ferrioxamine B. *Molecular microbiology* 70, 1261-1273.

Chevance, F.F., and Hughes, K.T. (2008). Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nature reviews. Microbiology* 6, 455-465.

Da Re, S.S., Deville-Bonne, D., Tolstykh, T., M, V.r., and Stock, J.B. (1999). Kinetics of CheY phosphorylation by small molecule phosphodonors. *FEBS letters* 457, 323-326.

Danhorn, T., and Fuqua., a.C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual review of microbiology* 61, 401-422.

Daniels, R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Janssens, J., Braeken, K., Fauvart, M., Beullens, S., Heusdens, C., Lambrichts, I., *et al.* (2006). Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 14965-14970.

Daniels, R., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS microbiology reviews* 28, 261-289.

Darnton, N.C., Turner, L., Rojevsky, S., and Berg, H.C. (2010). Dynamics of bacterial swarming. *Biophysical journal* 98, 2082-2090.

de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fairfull-Smith, K.E., and Hancock, R.E. (2013). The effect of nitroxides on swarming motility and biofilms, multicellular behaviors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.

Deng, M., and Misra, R. (1996). Examination of AsmA and its effect on the assembly of *Escherichia coli* outer membrane proteins. *Molecular microbiology* 21, 605-612.

Deziel, E., Lepine, F., Milot, S., and Villemur, R. (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149, 2005-2013.

Dharmatilake, A.J., and Bauer, W.D. (1992). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards Nodulation Gene-Inducing Compounds from Alfalfa Roots. *Applied and environmental microbiology* 58, 1153-1158.

Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X.W., Finlay, D.R. *et al* (1985). Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13, 149-153.

Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Arnedo, R., Becker, A., Olivares, J., Soto, M.J., and Sanjuán, J. (2006). Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 188, 7617-7625.

Dondrup, M., Goesmann, A., Bartels, D., Kalinowski, J., Krause, L., Linke, B., Rupp, O., Sczyrba, A., Pühler, A., and Meyer, F. (2003). EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *Journal of biotechnology* 106, 135-146.

Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., and Zhu, G. (2013). Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of basic microbiology* 53, 1-8.

Eberl, L., Molin, S., and Givskov, M. (1999). Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of bacteriology* 181, 1703-1712.

Edwards, A., Frederix, M., Wisniewski-Dye, F., Jones, J., Zorreguieta, A., and Downie, J.A. (2009). The cin and rai quorum-sensing regulatory systems in *Rhizobium*

- leguminosarum* are coordinated by ExpR and CinS, a small regulatory protein coexpressed with CinI. *Journal of bacteriology* 191, 3059-3067.
- Eggenhofer, E., Haslbeck, M., and Scharf, B. (2004). MotE serves as a new chaperone specific for the periplasmic motility protein, MotC, in *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular microbiology* 52, 701-712.
- Eggenhofer, E., Rachel, R., Haslbeck, M., and Scharf, B. (2006). MotD of *Sinorhizobium meliloti* and related alpha-proteobacteria is the flagellar-hook-length regulator and therefore reassigned as FliK. *Journal of bacteriology* 188, 2144-2153.
- Ferreira, R.B., Antunes, L.C., Greenberg, E.P., and McCarter, L.L. (2008). *Vibrio parahaemolyticus* ScrC modulates cyclic dimeric GMP regulation of gene expression relevant to growth on surfaces. *Journal of bacteriology* 190, 851-860.
- Finan, T.M., Hartweg, E., LeMieux, K., Bergman, K., Walker, G.C., and Signer, E.R. (1984). General transduction in *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 159, 120-124.
- Finan, T.M., Weidner, S., Wong, K., Buhrmester, J., Chain, P., Vorholter, F.J., Hernandez-Lucas, I., Becker, A., Cowie, A., Gouzy, J., *et al.* (2001). The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N<sub>2</sub>-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 9889-9894.
- Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews of microbiology* 8, 623-633.
- Fraser, G.M., and Hughes, C. (1999). Swarming motility. *Current opinion in microbiology* 2, 630-635.
- Fujishige, N., L. Rinaudi, W. Giordano, and Hirsch., a.A. (2006a). Superficial liaisons: colonization of roots and abiotic surfaces by rhizobia. *Biology of plant-microbe interactions* 5, 292-299.
- Fujishige, N.A. (2006). Molecular analysis of biofilm formation by *Rhizobium* species. University of California, Los Angeles.
- Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., De Hoff, P.L., and Hirsch, A.M. (2006b). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS microbiology ecology* 56, 195-206.
- Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., De Hoff, P.L., and Hirsch, A.M. (2006c). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS microbiology ecology* 56, 195-206.
- Fujishige, N.A., N. N. Kapadia, and Hirsch., a.A.M. (2006d). A feeling for the micro-organism: structure on a small scale. *Biofilms on plant roots. Botanical journal of the Linnean Society.* 150, 79-88.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C., and Greenberg, E.P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of bacteriology* 176, 269-275.
- Furness, R.B., Fraser, G.M., Hay, N.A., and Hughes, C. (1997). Negative feedback from a *Proteus* class II flagellum export defect to the flhDC master operon controlling cell division and flagellum assembly. *Journal of bacteriology* 179, 5585-5588.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S., and Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology* 13, 34-40.

- Galibert, F., Finan, T.M., Long, S.R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M.J., Becker, A., Boistard, P., *et al.* (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293, 668-672.
- Gao, M., Coggin, A., Yagnik, K., and Teplitski, M. (2012). Role of specific quorum-sensing signals in the regulation of exopolysaccharide II production within *Sinorhizobium meliloti* spreading colonies. *PLoS one* 7, e42611.
- García-Rodríguez, F.M., and Toro, N. (2000). *Sinorhizobium meliloti nfe* (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *Molecular plant-microbe interactions* 13, 583-591.
- Gibson, K.E., Barnett, M.J., Toman, C.J., Long, S.R., and Walker, G.C. (2007). The symbiosis regulator CbrA modulates a complex regulatory network affecting the flagellar apparatus and cell envelope proteins. *Journal of bacteriology* 189, 3591-3602.
- Glick, R., Gilmour, C., Tremblay, J., Satanower, S., Avidan, O., Deziel, E., Greenberg, E.P., Poole, K., and Banin, E. (2010). Increase in rhamnolipid synthesis under iron-limiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology* 192, 2973-2980.
- Gode-Potratz, C.J., Chodur, D.M., and McCarter, L.L. (2010). Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* 192, 6025-6038.
- González, V., Bustos, P., Ramírez-Romero, M.A., Medrano-Soto, A., Salgado, H., Hernández-González, I., Hernández-Celis, J.C., Quintero, V., Moreno-Hagelsieb, G., Girard, L., Rodríguez, O., Flores, M., Cevallos, M.A., Collado-Vides, J., Romero, D., Dávila, G. (2003). The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome biology* 4, R36.
- Gray, J.X., Djordjevic, M.A., and Rolfe, B.G. (1990). Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium* sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes. *Journal of bacteriology* 172, 193-203.
- Greck, M., Platzer, J., Sourjik, V., and Schmitt, R. (1995). Analysis of a chemotaxis operon in *Rhizobium meliloti*. *Molecular microbiology* 15, 989-1000.
- Griffitts, J.S., and Long, S.R. (2008). A symbiotic mutant of *Sinorhizobium meliloti* reveals a novel genetic pathway involving succinoglycan biosynthetic functions. *Molecular microbiology* 67, 1292-1306.
- Gurich, N., and González, J.E. (2009). Role of quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Journal of bacteriology* 191, 4372-4382.
- Gygi, D., Bailey, M.J., Allison, C., and Hughes, C. (1995a). Requirement for FlhA in flagella assembly and swarm-cell differentiation by *Proteus mirabilis*. *Molecular microbiology* 15, 761-769.
- Gygi, D., Rahman, M.M., Lai, H.C., Carlson, R., Guard-Petter, J., and Hughes, C. (1995b). A cell-surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of *Proteus mirabilis*. *Molecular microbiology* 17, 1167-1175.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews. Microbiology* 2, 95-108.
- Harshey, R.M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual review of microbiology* 57, 249-273.

- Harshey, R.M. (2010). Swarming adventures. In *The Lure of Bacterial Genetics: A Tribute to John Roth.*, S.M., Hughes, K.T., and Casadesús, J. (eds.). Washington, DC: ASM Press, pp. 163–172.
- Harshey, R.M., and Matsuyama, T. (1994). Dimorphic transition in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: surface-induced differentiation into hyperflagellate swarmer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8631-8635.
- He, Y.W., and Zhang, L.H. (2008). Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS microbiology reviews* 32, 842-857.
- Hellweg, C., Puhler, A., and Weidner, S. (2009). The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC microbiology* 9, 37.
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriological reviews* 36, 478-503.
- Hirsch, A., M. Lum, and N. Fujishige. (2009). *Microbial Encounters of a Symbiotic Kind: Attaching to Roots and Other Surfaces.* Plant cell monographs. Springer Berlin / Heidelberg.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
- Hoang, H.H., Gurich, N., and González, J.E. (2008). Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 190, 861-871.
- Inoue, T., Shingaki, R., Hirose, S., Waki, K., Mori, H., and Fukui, K. (2007). Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 189, 950-957.
- Iyoda, S., Kamidoi, T., Hirose, K., Kutsukake, K., and Watanabe, H. (2001). A flagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial pathogenesis* 30, 81-90.
- Johnston, A. W., Beringer, J.E. (1975). Identification of the rhizobium strains in pea root nodules using genetic markers. *Journal of general microbiology* 87, 343-350.
- Jones, B.V., Young, R., Mahenthalingam, E., and Stickler, D.J. (2004). Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. *Infection and immunity* 72, 3941-3950.
- Jones, K.M., Kobayashi, H., Davies, B.W., Taga, M.E., and Walker, G.C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature reviews. Microbiology* 5, 619-633.
- Kearns, D.B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature reviews. Microbiology* 8, 634-644.
- Kearns, D.B., and Losick, R. (2003). Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology* 49, 581-590.
- Kim, W., and Surette, M.G. (2004). Metabolic differentiation in actively swarming *Salmonella*. *Molecular microbiology* 54, 702-714.

- Kimps, N.W., Bissinger, B.W., Apperson, C.S., Sonenshine, D.E., and Roe, R.M. (2011). First report of the repellency of 2-tridecanone against ticks. *Medical and veterinary entomology* 25, 202-208.
- Krol, E., and Becker, A. (2004). Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Molecular genetics and genomics* 272, 1-17.
- Lai, S., Tremblay, J., and Deziel, E. (2009). Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental microbiology* 11, 126-136.
- Lederberg, E.M., and Cohen, S.N. (1974). Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of bacteriology* 119, 1072-1074.
- Lindstrom, K., Murwira, M., Willems, A., and Altier, N. (2010). The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Research in microbiology* 161, 453-463.
- Lindum, P.W., Anthoni, U., Christophersen, C., Eberl, L., Molin, S., and Givskov, M. (1998). N-Acyl-L-homoserine lactone autoinducers control production of an extracellular lipopeptide biosurfactant required for swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *Journal of bacteriology* 180, 6384-6388.
- Liu, G., Zhou, J., Fu, Q.S., and Wang, J. (2009). The *Escherichia coli* azoreductase AzoR Is involved in resistance to thiol-specific stress caused by electrophilic quinones. *Journal of bacteriology* 191, 6394-6400.
- Liu, X., Beyhan, S., Lim, B., Linington, R.G., and Yildiz, F.H. (2010). Identification and characterization of a phosphodiesterase that inversely regulates motility and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* 192, 4541-4552.
- Lu, A., Cho, K., Black, W.P., Duan, X.Y., Lux, R., Yang, Z., Kaplan, H.B., Zusman, D.R., and Shi, W. (2005). Exopolysaccharide biosynthesis genes required for social motility in *Myxococcus xanthus*. *Molecular microbiology* 55, 206-220.
- Lynch, D., O'Brien, J., Welch, T., Clarke, P., Cuiv, P.O., Crosa, J.H., and O'Connell, M. (2001). Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 183, 2576-2585.
- Ma, Q., Yang, Z., Pu, M., Peti, W., and Wood, T.K. (2011a). Engineering a novel c-di-GMP-binding protein for biofilm dispersal. *Environmental microbiology* 13, 631-642.
- Ma, Q., Zhang, G., and Wood, T.K. (2011b). *Escherichia coli* BdcA controls biofilm dispersal in *Pseudomonas aeruginosa* and *Rhizobium meliloti*. *BMC research notes* 4, 447.
- Macnab, R.M. (1996). Flagella and motility. In *Escherichia coli* and *Salmonella*, Vol. 1. Neidhardt, F.C., Curtiss, R. III, Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., and Reznikoff, W.S. (eds). Washington: American Society for Microbiology Press, pp. 123-145.
- Madinabeitia, N., Bellogin, R.A., Buendia-Claveria, A.M., Camacho, M., Cubo, T., Espuny, M.R., Gil-Serrano, A.M., Lyra, M.C., Moussaid, A., Ollero, F.J., Soria-Diaz, M.E., Vinardell, J.M., Zeng, J., Ruiz-Sainz, J.E. (2002). *Sinorhizobium fredii* HH103 has a truncated *nolO* gene due to a -1 frameshift mutation that is conserved among other geographically distant *S. fredii* strains. *Molecular plant-microbe interactions* 15, 150-159

- Mariconda, S., Wang, Q., and Harshey, R.M. (2006). A mechanical role for the chemotaxis system in swarming motility. *Molecular microbiology* 60, 1590-1602.
- Mateos, P.F. (1995). Direct in situ identification of cellulose microfibrils associated with *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii attached to the root epidermis of white clover. *Canadian journal of microbiology* 41, 202-207.
- Matilla, M.A., Ramos, J.L., Duque, E., de Dios Alche, J., Espinosa-Urgel, M., and Ramos-Gonzalez, M.I. (2007). Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environmental microbiology* 9, 1842-1850.
- Maunoury, N., Kondorosy, A., Kondorosy, E., and Mergaert, P. (2008). Cell biology of nodule infection and development. En: Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds). pp. 153-189, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- May, T., and Okabe, S. (2011). Enterobactin is required for biofilm development in reduced-genome *Escherichia coli*. *Environmental microbiology* 13, 3149-3162.
- McCarter, L. (1999). The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 1, 51-57.
- McCarter, L., Hilmen, M., and Silverman, M. (1988). Flagellar dynamometer controls swarmer cell differentiation of *V. parahaemolyticus*. *Cell* 54, 345-351.
- Meade, H.M., and Signer, E.R. (1977). Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 2076-2078.
- Merritt, J.H., Brothers, K.M., Kuchma, S.L., and O'Toole, G.A. (2007). SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function. *Journal of bacteriology* 189, 8154-8164.
- Miller, J.H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Miller, L.D., Yost, C.K., Hynes, M.F., and Alexandre, G. (2007). The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae is essential for competitive nodulation. *Molecular microbiology* 63, 348-362.
- Miller, M.B., and Bassler, B.L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology* 55, 165-199.
- Minamino, T. (2013). Protein export through the bacterial flagellar type III export pathway. *Biochimica et biophysica acta*.
- Mireles, J.R., 2nd, Toguchi, A., and Harshey, R.M. (2001). *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of bacteriology* 183, 5848-5854.
- Morgenstein, R.M., Szostek, B., and Rather, P.N. (2010). Regulation of gene expression during swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *FEMS microbiology reviews* 34, 753-763.
- Morris, J., and González, J.E. (2009). The novel genes emmABC are associated with exopolysaccharide production, motility, stress adaptation, and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 191, 5890-5900.
- Müller, P., Keller, M., Weng, W.M., Quandt, J., Arnold, W., and Puhler, A. (1993). Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoYFQ* operon: ExoY is homologous to

- sugar transferases and ExoQ represents a transmembrane protein. *Molecular plant-microbe interactions* 6, 55-65.
- Mulligan, J.T., and Long, S.R. (1985). Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudate requires nodD. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 82, 6609-6613.
- Nogales, J., Bernabéu-Roda, L., Cuéllar, V., and Soto, M.J. (2012). ExpR is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology*.
- Nogales, J., Domínguez-Ferreras, A., Amaya-Gómez, C.V., van Dillewijn, P., Cuéllar, V., Sanjuán, J., Olivares, J., and Soto, M.J. (2010). Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti* *fadD* mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC genomics* 11, 157.
- O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B., and Kolter, R. (1999). Genetic approaches to study of biofilms. *Methods in enzymology* 310, 91-109.
- Oldroyd, G.E., Murray, J.D., Poole, P.S., and Downie, J.A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual review of genetics* 45, 119-144.
- Olivares, J., Casadesus, J., and Bedmar, E.J. (1980). Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Applied and environmental microbiology* 39, 967-970.
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M.D., and Hancock, R.E. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of bacteriology* 190, 2671-2679.
- Overhage, J., Lewenza, S., Marr, A.K., and Hancock, R.E. (2007). Identification of genes involved in swarming motility using a *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mini-Tn5-lux mutant library. *Journal of bacteriology* 189, 2164-2169.
- Partridge, J.D., and Harshey, R.M. (2013a). More than motility: *Salmonella* flagella contribute to overriding friction and facilitating colony hydration during swarming. *Journal of bacteriology* 195, 919-929.
- Partridge, J.D., and Harshey, R.M. (2013b). Swarming: flexible roaming plans. *Journal of bacteriology* 195, 909-918.
- Patrick, J.E., and Kearns, D.B. (2012). Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis. *Molecular microbiology* 83, 14-23.
- Pech-Canul, A., Nogales, J., Miranda-Molina, A., Álvarez, L., Geiger, O., Soto, M.J., and López-Lara, I.M. (2011). *FadD* is required for utilization of endogenous fatty acids released from membrane lipids. *Journal of bacteriology* 193, 6295-6304.
- Pehl, M.J., Jamieson, W.D., Kong, K., Forbester, J.L., Fredendall, R.J., Gregory, G.A., McFarland, J.E., Healy, J.M., and Orwin, P.M. (2012). Genes that influence swarming motility and biofilm formation in *Variovorax paradoxus* EPS. *PloS one* 7, e31832.
- Perret, X., Staehelin, C., and Broughton, W.J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and molecular biology reviews* 64, 180-201.
- Platzer, J., Sterr, W., Hausmann, M., and Schmitt, R. (1997). Three genes of a motility operon and their role in flagellar rotary speed variation in *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 179, 6391-6399.
- Pratt, J.T., McDonough, E., and Camilli, A. (2009). PhoB regulates motility, biofilms, and cyclic di-GMP in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* 191, 6632-6642.

- Prieto, A.I., Hernández, S.B., Cota, I., Pucciarelli, M.G., Orlov, Y., Ramos-Morales, F., García-del Portillo, F., and Casadesús, J. (2009). Roles of the outer membrane protein AsmA of *Salmonella enterica* in the control of *marRAB* expression and invasion of epithelial cells. *Journal of bacteriology* 191, 3615-3622.
- Rashid, M.H., and Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 4885-4890.
- Rather, P.N. (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environmental microbiology* 7, 1065-1073.
- Rauprich, O., Matsushita, M., Weijer, C.J., Siegert, F., Esipov, S.E., and Shapiro, J.A. (1996). Periodic phenomena in *Proteus mirabilis* swarm colony development. *Journal of bacteriology* 178, 6525-6538.
- Reed, J.W., Capage, M., and Walker, G.C. (1991). *Rhizobium meliloti* *exoG* and *exoJ* mutations affect the *exoX-exoY* system for modulation of exopolysaccharide production. *Journal of bacteriology* 173, 3776-3788.
- Rigaud, J., and Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *Journal of general microbiology* 88, 223-228.
- Rinaudi, L.V., and Giordano, W. (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS microbiology letters* 304, 1-11.
- Rinaudi, L.V., and Gonzáez, J.E. (2009). The low-molecular-weight fraction of exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* is a crucial determinant of biofilm formation. *Journal of bacteriology* 191, 7216-7224.
- Robertsen, B.K., Aman, P., Darvill, A.G., McNeil, M., and Albersheim, P. (1981). The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant physiology* 67, 389-400.
- Robledo, M., Jiménez-Zurdo, J.I., Velázquez, E., Trujillo, M.E., Zurdo-Pineiro, J.L., Ramírez-Bahena, M.H., Ramos, B., Díaz-Minguez, J.M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E., *et al.* (2008). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 7064-7069.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S., and Ruíz-Sainz, J.E. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS microbiology letters* 272, 127-136.
- Rodríguez, R.L., and Tait, R.C. (1983). *Recombinant DNA techniques: an introduction*. Addison-Wesley, Reading, Massachusetts.
- Rotter, C., Muhlbacher, S., Salamon, D., Schmitt, R., and Scharf, B. (2006). Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 188, 6932-6942.
- Rüberg, S., Tian, Z.-X., Krol, E., Linke, B., Meyer, F., Wang, Y., Pühler, A., Weidner, S., and Becker, A. (2003). Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *Journal of biotechnology* 106, 255-268.
- Russo, D.M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D.M., Finnie, C., Dankert, M., Downie, J.A., and Zorreguieta, A. (2006). Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of bacteriology* 188, 4474-4486.



- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sandy, M., and Butler, A. (2009). Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores. *Chemical reviews* 109, 4580-4595.
- Santos, M.R., Marques, A.T., Becker, J.D., and Moreira, L.M. (2014). The *Sinorhizobium meliloti* EmrR regulator is required for efficient colonization of *Medicago sativa* root nodules. *Molecular plant-microbe interactions* 27, 388-399.
- Santos, R., Bocquet, S., Puppo, A., and Touati, D. (1999). Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 181, 4509-4516.
- Santos, R., Herouart, D., Puppo, A., and Touati, D. (2000). Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in rhizobium-legume symbiosis. *Molecular microbiology* 38, 750-759.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69-73.
- Scharf, B., and Schmitt, R. (2002). Sensory transduction to the flagellar motor of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 4, 183-186.
- Scharf, B., Schuster-Wolf-Buhring, H., Rachel, R., and Schmitt, R. (2001). Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *Journal of bacteriology* 183, 5334-5342.
- Schmitt, R. (2002). Sinorhizobial chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. *Microbiology* 148, 627-631.
- Schorkopf, D.L., Hrnčir, M., Mateus, S., Zucchi, R., Schmidt, V.M., and Barth, F.G. (2009). Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. *The Journal of experimental biology* 212, 1153-1162.
- Shrout, J.D., Chopp, D.L., Just, C.L., Hentzer, M., Givskov, M., and Parsek, M.R. (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular microbiology* 62, 1264-1277.
- Simon, R., Prierer, U., and Puhler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *In vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nature biotechnology* 1, 784-791.
- Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A., and Krol, J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microbial cell factories* 5, 7.
- Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B.J., and Kijne, J.W. (1992). Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Molecular microbiology* 6, 2897-2903.
- Smith, T.G., and Hoover, T.R. (2009). Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. *Advances in applied microbiology* 67, 257-295.

- Soby, S., and Bergman, K. (1983). Motility and Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* in Soil. *Applied and environmental microbiology* 46, 995-998.
- Soto, M.J., Nogales, J., Olivares, J., Sanjuán, P., (2013). Method for preventing and/or controlling bacterial infections. PCT/ES2013/070570
- Soto, M.J., Domínguez-Ferreras, A., Pérez-Mendoza, D., Sanjuán, J., and Olivares, J. (2009). Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cellular microbiology* 11, 381-388.
- Soto, M.J., Fernández-Pascual, M., Sanjuán, J., and Olivares, J. (2002). A *fadD* mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. *Molecular microbiology* 43, 371-382.
- Soto, M.J., Sanjuán, J., and Olivares, J. (2006). Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* 152, 3167-3174.
- Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B., and Schmitt, R. (2000). VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *Journal of bacteriology* 182, 782-788.
- Sourjik, V., and Schmitt, R. (1996). Different roles of *CheY1* and *CheY2* in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Molecular microbiology* 22, 427-436.
- Sourjik, V., Sterr, W., Platzer, J., Bos, I., Haslbeck, M., and Schmitt, R. (1998). Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* 223, 283-290.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of molecular biology* 98, 503-517.
- Supanjani, S., Habib, A., Mabood, F., Lee, K.D., Donnelly, D., and Smith, D.L. (2006). Nod factor enhances calcium uptake by soybean. *Plant physiology and biochemistry. Societe francaise de physiologie vegetale* 44, 866-872.
- Takahashi, C., Nozawa, T., Tanikawa, T., Nakagawa, Y., Wakita, J., Matsushita, M., and Matsuyama, T. (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 without differentiation into elongated hyperflagellates on hard agar minimal medium. *FEMS microbiology letters* 280, 169-175.
- Tambalo, D.D., Vanderlinde, E.M., Robinson, S., Halmillawewa, A., Hynes, M.F., and Yost, C.K. (2014). Legume seed exudates and *Physcomitrella patens* extracts influence swarming behavior in *Rhizobium leguminosarum*. *Canadian journal of microbiology* 60, 15-24.
- Tambalo, D.D., Yost, C.K., and Hynes, M.F. (2010). Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *FEMS microbiology letters* 307, 165-174.
- Terashima, H., Kojima, S., y Homma, M. (2008). Flagellar motility in bacteria structure and fuction of flagellar motor. *International review of cell and molecular biology* 270, 39-85.
- Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M., and Harshey, R.M. (2000). Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*: critical role for lipopolysaccharide. *Journal of bacteriology* 182, 6308-6321.
- Tremblay, J., and Deziel, E. (2008). Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. *Journal of basic microbiology* 48, 509-515.

- Tremblay, J., and Deziel, E. (2010). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC genomics* 11, 587.
- Tuson, H.H., Copeland, M.F., Carey, S., Sacotte, R., and Weibel, D.B. (2013). Flagellum density regulates *Proteus mirabilis* swarmer cell motility in viscous environments. *Journal of bacteriology* 195, 368-377.
- van Brussel, A.A., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H.P., Tak, T., Lugtenberg, B.J., and Kijne, J.W. (1992). Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* 257, 70-72.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., and Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in microbiology* 16, 496-506.
- Wadhams, G.H., and Armitage, J.P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5, 1024-1037.
- Wandersman, C., and Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual review of microbiology* 58, 611-647.
- Wang, D., Xue, H., Wang, Y., Yin, R., Xie, F., and Luo, L. (2013). The *Sinorhizobium meliloti ntrX* gene is involved in succinoglycan production, motility, and symbiotic nodulation on alfalfa. *Applied and environmental microbiology* 79, 7150-7159.
- Wang, P., Zhong, Z., Zhou, J., Cai, T., and Zhu, J. (2008). Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: plant host interaction. *Archives of microbiology* 189, 525-530.
- Wang, Q., Frye, J.G., McClelland, M., and Harshey, R.M. (2004). Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Molecular microbiology* 52, 169-187.
- Wang, Q., Suzuki, A., Mariconda, S., Porwollik, S., and Harshey, R.M. (2005). Sensing wetness: a new role for the bacterial flagellum. *The EMBO journal* 24, 2034-2042.
- Wang, Y., Xu, J., Chen, A., Zhu, J., Yu, G., Xu, L., and Luo, L. (2010). GGDEF and EAL proteins play different roles in the control of *Sinorhizobium meliloti* growth, motility, exopolysaccharide production, and competitive nodulation on host alfalfa. *Acta biochimica et biophysica sinica* 42, 410-417.
- Waters, C.M. (2013). Bacterial wheel locks: extracellular polysaccharide inhibits flagellar rotation. *Journal of bacteriology* 195, 409-410.
- Webb, B.A., Hildreth, S., Helm, R.F., and Scharf, B.E. (2014). *Sinorhizobium meliloti* chemoreceptor McpU mediates chemotaxis toward host plant exudates through direct proline sensing. *Applied and environmental microbiology* 80, 3404-3415.
- Wells, D.H., Chen, E.J., Fisher, R.F., and Long, S.R. (2007). ExoR is genetically coupled to the ExoS-ChvI two-component system and located in the periplasm of *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular microbiology* 64, 647-664.
- Wexler, M., Yeoman, K.H., Stevens, J.B., de Luca, N.G., Sawers, G., and Johnston, A.W. (2001). The *Rhizobium leguminosarum tonB* gene is required for the uptake of siderophore and haem as sources of iron. *Molecular microbiology* 41, 801-816.
- Williams, W.G., Kennedy, G.G., Yamamoto, R.T., Thacker, J.D., and Bordner, J. (1980). 2-Tridecanone: A Naturally Occurring Insecticide from the Wild *Tomato Lycopersicon hirsutum f.glabratum*. *Science* 207, 888-889.

- Winans, S.C. (2011). A new family of quorum sensing pheromones synthesized using S-adenosylmethionine and Acyl-CoAs. *Molecular microbiology* 79, 1403-1406.
- Wood, W.F., Shaffer, T.B., and Kubo, A. (1995). Volatile ketones from interdigital glands of black-tailed deer, *Odocoileus hemionus columbianus*. *Journal of chemical ecology* 21, 1401-1408.
- Xu, J., Platt, T.G., and Fuqua, C. (2012). Regulatory linkages between flagella and surfactant during swarming behavior: lubricating the flagellar propeller? *Journal of bacteriology* 194, 1283-1286.
- Yost, C.K., Del Bel, K.L., Quandt, J., and Hynes, M.F. (2004). *Rhizobium leguminosarum* methyl-accepting chemotaxis protein genes are down-regulated in the pea nodule. *Archives of microbiology* 182, 505-513.
- Young, G.M., Schmiel, D.H., and Miller, V.L. (1999). A new pathway for the secretion of virulence factors by bacteria: the flagellar export apparatus functions as a protein-secretion system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6456-6461.
- Zhan, H.J., and Leigh, J.A. (1990). Two genes that regulate exopolysaccharide production in *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 172, 5254-5259.

## ExpR Is Not Required for Swarming but Promotes Sliding in *Sinorhizobium meliloti*

Joaquina Nogales, Lydia Bernabéu-Roda, Virginia Cuéllar and María J. Soto  
*J. Bacteriol.* 2012, 194(8):2027. DOI: 10.1128/JB.06524-11.  
Published Ahead of Print 10 February 2012.

---

Updated information and services can be found at:  
<http://jb.asm.org/content/194/8/2027>

---

	<i>These include:</i>
<b>REFERENCES</b>	This article cites 45 articles, 25 of which can be accessed free at: <a href="http://jb.asm.org/content/194/8/2027#ref-list-1">http://jb.asm.org/content/194/8/2027#ref-list-1</a>
<b>CONTENT ALERTS</b>	Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), <a href="#">more»</a>

---

---

Information about commercial reprint orders: <http://jb.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>  
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

---

# ExpR Is Not Required for Swarming but Promotes Sliding in *Sinorhizobium meliloti*

Joaquina Nogales, Lydia Bernabéu-Roda, Virginia Cuéllar, and María J. Soto

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

Swarming is a mode of translocation dependent on flagellar activity that allows bacteria to move rapidly across surfaces. In several bacteria, swarming is a phenotype regulated by quorum sensing. It has been reported that the swarming ability of the soil bacterium *Sinorhizobium meliloti* Rm2011 requires a functional ExpR/Sin quorum-sensing system. However, our previous published results demonstrate that strains Rm1021 and Rm2011, both known to have a disrupted copy of *expR*, are able to swarm on semisolid minimal medium. In order to clarify these contradictory results, the role played by the LuxR-type regulator ExpR has been reexamined. Results obtained in this work revealed that *S. meliloti* can move over semisolid surfaces using at least two different types of motility. One type is flagellum-independent surface spreading or sliding, which is positively influenced by a functional *expR* gene mainly through the production of exopolysaccharide II (EPS II). To a lesser extent, EPS II-deficient strains can also slide on surfaces by a mechanism that is at least dependent on the siderophore rhizobactin 1021. The second type of surface translocation shown by *S. meliloti* is swarming, which is greatly dependent on flagella and rhizobactin 1021 but does not require ExpR. We have extended our study to demonstrate that the production of normal amounts of succinoglycan (EPS I) does not play a relevant role in surface translocation but that its overproduction facilitates both swarming and sliding motilities.

Bacteria can move using different types of translocation. Swimming is a flagellum-driven motility that takes place in liquid environments. Bacterial translocation over surfaces can occur by twitching, gliding, sliding, and swarming (18, 19). Twitching is a slow cell movement on surfaces that is mediated by the extension and retraction of type IV pili. Gliding, a surface translocation extensively studied in myxobacteria, does not require flagella or pili but involves focal adhesion complexes, cell surface-associated complexes that anchor the bacterium to a substrate and might act as a motor. Sliding or spreading by expansion has been described as a passive surface translocation that is powered by the outward pressure of bacterial growth and facilitated by compounds that reduce friction between cells and surfaces. Swarming is a mode of surface translocation dependent on rotating flagella characterized by the rapid and coordinated movement of multicellular groups of bacteria. It is considered the fastest known type of bacterial motility on surfaces, with speeds of translocation very similar to the swimmer's speeds (up to 40  $\mu\text{m/s}$ ) (18). This allows swarmer cells to rapidly colonize different environments. An additional and distinguishing feature of swarming is that it can involve a complex process of morphological and physiological differentiation. Cells usually (but not always) become hyperflagellated and elongated, and substantial alterations in metabolic pathways and gene expression have been observed (24, 33, 46). This process is known to be triggered upon integration of several chemical and physical signals (12, 23, 45). Swarming has been described as a quorum-sensing-regulated phenotype in several bacteria (8). Quorum-sensing systems have been reported to be involved in the production of biosurfactants that act as wetting agents which reduce the surface tension during surface migration and in swarmer cell differentiation.

Swarming motility is not well characterized in the soil bacteria collectively known as rhizobia that are able to establish nitrogen-fixing symbiosis with legume plants. To date, within rhizobia, this surface motility has been described in *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium etli*, and *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* (7, 42,

44). *R. etli* has been demonstrated to have a quorum-sensing-regulated swarming motility: mutations affecting the *cinIR* quorum-sensing system abolish surface translocation in this bacterium. Moreover, it has been shown that *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) carrying a long-chain fatty acid moiety have a dual role in swarming of *R. etli*: as quorum-sensing signals and as biosurfactants which promote surface translocation (7).

*S. meliloti* possesses the ExpR/Sin quorum-sensing system, which is composed of two transcriptional regulators, ExpR and SinR, and the autoinducer synthase SinI, which is responsible for the synthesis of several AHLs (26). The *sin* AHLs, together with ExpR, control the expression of a large number of genes involved in several free-living and symbiotic cell functions, such as the production of the exopolysaccharides (EPS) succinoglycan (EPS I) and galactoglucan (EPS II) or motility (13, 16, 21, 22). In *S. meliloti*, the expression of motility genes is downregulated at high population densities. This control is exerted by the ExpR/Sin system via the *visNR* operon, which codes for the master regulator of flagellar, motility, and chemotaxis genes. At low cell densities, ExpR is required for the activation of motility-related genes, whereas at high population densities, ExpR, in conjunction with AHLs, inhibits transcription of the *visNR* operon, resulting in the repression of genes belonging to the flagellar regulon (16).

It has been reported that swarming of *S. meliloti* depends on the presence of a functional ExpR/Sin quorum-sensing system (2, 13). Two different laboratories have reported that only strains carrying a functional *expR* locus were able to swarm. However, our recent data are in disagreement with these findings. We have reported

Received 15 November 2011 Accepted 4 February 2012

Published ahead of print 10 February 2012

Address correspondence to María J. Soto, mariajose.soto@eez.csic.es.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.06524-11

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics <sup>a</sup>	Reference or source
<i>S. meliloti</i> strains		
Rm2011	Wild type; Nal <sup>r</sup> Str <sup>r</sup>	6
Rm1021	SU47 <i>expR102::ISRm2011-1</i> ; Str <sup>r</sup>	28
Rm8530	Rm1021 <i>expR</i> <sup>+</sup> ; Str <sup>r</sup>	14
2011m.E07	2011mTn5STM.1.03.E07, Rm2011 <i>flgE::mini-Tn5</i> ; Nal <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	35
2011mTn5STM.4.06.G01	Rm2011 <i>wgeB::mini-Tn5</i> ; Nal <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	35
Sm2B3001	Rm2011 with a restored <i>expR</i> gene; Nal <sup>r</sup> Str <sup>r</sup>	2
Sm2B5005	Sm2B3001 <i>flgE::mini-Tn5</i> ; Nal <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	2
Sm2B6005	Sm2B3001 <i>visN::Spt</i> <sup>r</sup> ; Nal <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Spt <sup>r</sup>	2
2011R	Rm2011 with a restored <i>expR</i> gene; Nal <sup>r</sup> Str <sup>r</sup>	This study
2011RFg	2011R <i>flgE::mini-Tn5</i> ; Nal <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	This study
2011rhbA62	Rm2011 <i>rhbA::Tn5lac</i> ; Str <sup>r</sup> Rif <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	25
QN1021	Rm1021 with a fully deleted <i>expR</i> locus; Str <sup>r</sup>	This study
1021F	Rm1021 <i>flaA flaB</i> ; Str <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	This study
1021R	Rm1021 with a restored <i>expR</i> gene; Str <sup>r</sup>	This study
1021rhbA	Rm1021 <i>rhbA::Tn5lac</i> ; Str <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	This study
1021Y	Rm1021 $\Delta$ <i>exoY</i> ; Str <sup>r</sup>	This study
1021YF	1021Y <i>flaA flaB</i> ; Str <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	This study
1021X	Rm1021 $\Delta$ <i>exoX</i> ; Str <sup>r</sup>	This study
1021XF	1021X <i>flaA flaB</i> ; Str <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	This study
1021XY	1021X $\Delta$ <i>exoY</i> ; Str <sup>r</sup>	This study
Rm11601	Rm8530 <i>flaA flaB</i> ; Str <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	16
8530Vis	Rm8530 with full deletion of <i>visN visR</i> ; Str <sup>r</sup>	B. Scharf
8530Fg	Rm8530 <i>flgE::mini-Tn5</i> ; Str <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	This study
Rm9020	Rm8530 <i>exoY::Tn5-132</i> ; Str <sup>r</sup> Otc <sup>r</sup>	15
11601Y	Rm11601 $\Delta$ <i>exoY</i> ; Str <sup>r</sup> Hyg <sup>r</sup>	This study
8530W	Rm8530 <i>wgeB::mini-Tn5</i> ; Str <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	This study
11601W	Rm11601 <i>wgeB::mini-Tn5</i> ; Str <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	This study
<i>E. coli</i> strains		
DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> $\phi$ 80d <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i> <i>hsdR171</i>	Bethesda Research Lab
S17-1	<i>thi pro recA hsdR hsdM</i> ; Rp4Tc::Mu, Km::Tn7; Tmp <sup>r</sup> Str <sup>r</sup> Spt <sup>r</sup>	41
Plasmids		
pCR-XL-TOPO	Cloning vector; Kan <sup>r</sup>	Invitrogen
pK18 <i>mobsacB</i>	Suicide plasmid; Kan <sup>r</sup>	39
pK18- $\Delta$ <i>expR</i>	pK18 <i>mobsacB</i> carrying the deleted version of the <i>expR</i> locus; Kan <sup>r</sup>	This study
pK18- <i>expR</i>	pK18 <i>mobsacB</i> carrying the <i>expR</i> gene from Rm8530; Kan <sup>r</sup>	This study
pK18- $\Delta$ <i>exoY</i>	pK18 <i>mobsacB</i> carrying the deleted version of the <i>exoY</i> locus; Kan <sup>r</sup>	This study
pK18- $\Delta$ <i>exoX</i>	pK18 <i>mobsacB</i> carrying the deleted version of the <i>exoX</i> locus; Kan <sup>r</sup>	This study

<sup>a</sup> Nal<sup>r</sup>, Str<sup>r</sup>, Neo<sup>r</sup>, Spt<sup>r</sup>, Rif<sup>r</sup>, Hyg<sup>r</sup>, Otc<sup>r</sup>, Tmp<sup>r</sup>, and Kan<sup>r</sup> indicate nalidixic acid, streptomycin, neomycin, spectinomycin, rifampin, hygromycin, oxytetracycline, trimethoprim, and kanamycin resistance, respectively.

that the commonly used *S. meliloti* laboratory strain Rm1021 and the closely related strain Rm2011, both known to have a disrupted copy of *expR*, are able to swarm on semisolid minimal medium (32). To solve the discrepancies between these reports, in this work, we have reexamined the role played by the *expR* gene in swarming of *S. meliloti*. In addition, we have extended our studies to investigate the role of exopolysaccharides EPS I and EPS II in the surface motility of this bacterium.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.** Bacterial strains and plasmids used in this work and their relevant characteristics are listed in Table 1. *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium (38) at 37°C; *S. meliloti* strains were grown at 30°C either in complex tryptone yeast (TY) medium (4), in Bromfield medium (BM) (0.04% tryptone, 0.01% yeast extract, and 0.01% CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O), or in minimal medium (MM) containing glutamate (6.5 mM), mannitol (55 mM), mineral salts (1.3 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O, 0.6 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.34 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.022 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.86 mM NaCl), and vitamins (0.2 mg/liter biotin, 0.1 mg/liter calcium pantothenate)

(37). To detect overproduction of EPS I, calcofluor white M2R (fluorescent brightener 28; Sigma) was added to TY or MM plates at a final concentration of 0.02%. When required, antibiotics were added at final concentrations of 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> streptomycin, 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> spectinomycin, and 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> kanamycin for *E. coli* and 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> nalidixic acid, 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> streptomycin, 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> spectinomycin, 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> rifampin, 200  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> kanamycin, 120  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> neomycin, 75 to 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> hygromycin, and 0.75  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> oxytetracycline for *S. meliloti*. To improve reproducibility, all liquid cultures of *S. meliloti* were routinely initiated from glycerol stocks. The ability of the different strains to grow in liquid TY, BM, and MM was monitored every 2 h in a Bioscreen C apparatus (Oy Growth Curves Ab Ltd., Finland).

**Construction of *S. meliloti* strains.** For the construction of *expR*<sup>+</sup> derivatives of Rm1021 (1021R) and Rm2011 (2011R), the functional *expR* gene of Rm8530 was PCR amplified using primers Rmpyc and SmndvA2 (Table 2), cloned into pCR-XL-TOPO, and sequenced. This construct was digested with EcoRI, and the 1,550-bp fragment containing the functional *expR* gene was isolated and subcloned into pK18*mobsacB* to yield plasmid pK18-*expR*. This plasmid was introduced into Rm1021 and Rm2011 via conjugation with *E. coli* strain S17-1, and allele replacement events were



TABLE 2 Primers used in this study

Primer	Sequence (5' to 3') <sup>a</sup>	Use
Rmpyc	AGAGTGGCGTGAACATTCGG	<i>expR</i> restoration
SmndvA2	TCCTTCTGTGACGAGATCG	<i>expR</i> restoration
ExpR.1	AAA <u>AA</u> AGCTTGGCTTTTCGAGATAGACCTCG (HindIII)	<i>expR</i> deletion
ExpR.2	CGTACAGTTCTGGCTGGTACATGAACG	<i>expR</i> deletion
ExpR.3	CGTTCATGTACCAGCCAGAACTGTACGAGC	<i>expR</i> deletion
ExpR.4	AAAGGATCCCGTGAACCTTCTTCAGTTCGC (BamHI)	<i>expR</i> deletion
delexoY.1	AAAGGATCCACCTCATAAGAGTTGTTGCC (BamHI)	<i>exoY</i> deletion
delexoY.2	GGACATATTGCGTGTGGCCATACCTCC	<i>exoY</i> deletion
delexoY.3	GGAGGTATGGCAAACACGCAATATGTCC	<i>exoY</i> deletion
delexoY.4	AAAGGATCC AATACCGTCAAATTGGGAGC (BamHI)	<i>exoY</i> deletion
exoX1	AATAAGCTTGGACTTCATAGAGGTGACTC (HindIII)	<i>exoX</i> deletion
exoX2	GCTCAGGAATTGAGGGTGCGAACATGGC	<i>exoX</i> deletion
exoX3	GCCATGTTCCGACCCTCAATTCCTGAGCGGC	<i>exoX</i> deletion
exoX4	AATGGATCCGAGCGTAGAGATCGTAATC (BamHI)	<i>exoX</i> deletion

<sup>a</sup> Restriction sites used for cloning (underlined) are given in parentheses after the sequence.

selected as described previously (39). In this case, clones in which allelic exchange occurred were easily identified, as they showed a very noticeable mucoid phenotype. *S. meliloti* strain QN1021 (*expR*) was obtained by replacing the disrupted *expR* locus of Rm1021 comprising the insertion sequence (IS) ISRm2011-1 and the IS-flanking loci *smc03896* and *smc03899* (<http://iant.toulouse.inra.fr/bacteria/annotation/cgi/rhime.cgi>) (34) with an unmarked deleted version. The *expR* deletion was generated *in vitro* by overlap extension PCR (20) using primers ExpR.1 to ExpR.4, listed in Table 2. The resulting fusion product, in which a deletion of 1,943 bp was created, was cloned into pCR-XL-TOPO and sequenced. Using the HindIII and BamHI restriction sites included in the outside primers, the insert was subcloned into vector pK18*mobsacB*, yielding plasmid pK18- $\Delta$ expR. This construction was introduced into Rm1021 via conjugation with S17-1, and allele replacement events were selected as described previously (39). Likewise, *S. meliloti* mutant strains with deletion-containing versions of *exoX* and *exoY* were obtained by allelic replacement using the same methodology. The *exoX* and *exoY* mutant alleles harboring in-frame deletions of 274 and 501 bp, respectively, were generated *in vitro* by overlap extension PCR using primers listed in Table 2. The resulting PCR products were cloned into pCR-XL-TOPO, sequenced, and, by using the restriction sites included in the outside primers, subcloned into vector pK18*mobsacB* to yield plasmids pK18- $\Delta$ exoX and pK18- $\Delta$ exoY. pK18- $\Delta$ exoX was introduced into Rm1021, and after selection of allele replacement, the EPS I-overproducer 1021X strain was obtained. pK18- $\Delta$ exoY was introduced into Rm1021, Rm11601, and 1021X to yield the corresponding mutant strains defective in EPS I (1021Y, 11601Y, and 1021XY, respectively). Phage  $\Phi$ M12 transduction (10) was employed to transfer mutations among strains in the following manners. (i) The *flaA flaB* mutants 1021F (*expR flaA flaB*), 1021YF (*expR exoY flaA flaB*), and 1021XF (*expR exoX flaA flaB*) were obtained by transferring the  $\Delta$ *flaA flaB*::Hyg mutation from strain Rm11601 (*expR<sup>+</sup> flaA flaB*) to strains Rm1021 (*expR*), 1021Y (*expR exoY*), and 1021X (*expR exoX*), respectively. (ii) The *flgE* mutants 2011RFg (*expR<sup>+</sup> flgE*) and 8530Fg (*expR<sup>+</sup> flgE*) were obtained by transferring the *flgE*::mini-Tn5 mutation from strain 2011mTn5STM.1.03.E07 to 2011R (*expR<sup>+</sup>*) and Rm8530 (*expR<sup>+</sup>*), respectively. (iii) The *rhbA* mutant 1021rhbA (*expR rhbA*) was obtained by transferring the *rhbA*::Tn5lac mutation from strain 2011rhbA62 to Rm1021 (*expR*). (iv) Likewise, the *wgeB* mutants 8530W (*expR<sup>+</sup> wgeB*) and 11601W (*expR<sup>+</sup> flaA flaB wgeB*) were obtained by transferring the mini-Tn5 disrupted locus *wgeB* from strain 2011mTn5STM.4.06.G01 to strains Rm8530 and Rm11601, respectively. All mutants constructed in this work were checked by PCR and Southern hybridization with specific probes.

**Motility assays.** Swimming was examined on plates prepared with BM containing 0.3% Bacto agar and inoculated with 3- $\mu$ l droplets of rhizobial cultures grown in TY (optical density at 600 nm = 1). Surface motility was analyzed using two different methodologies: (i) the motility assay described by Bahlawane et al. (2) in which 3  $\mu$ l of overnight TY rhizobial cultures was inoculated onto the surface of BM containing 0.6% Bacto

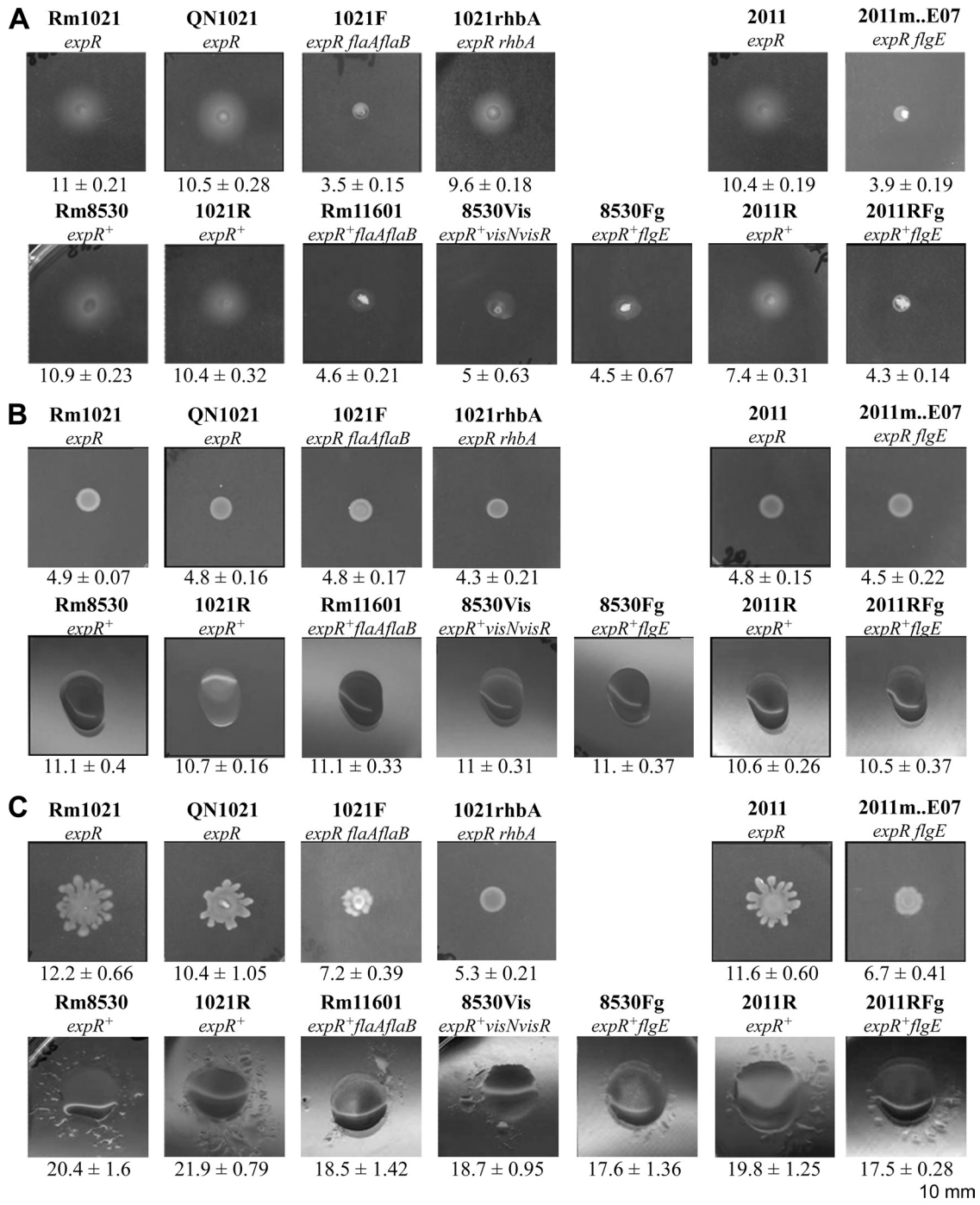
agar and (ii) the motility test described in our previous work (32, 42) in which 2  $\mu$ l of washed, 10-fold-concentrated of cultures grown in TY broth to the late exponential phase was inoculated onto semisolid MM plates. For swimming and surface motility tests performed on BM, the migration zone was determined as the colony diameter in millimeters. In the case of surface motility tests performed on semisolid MM, in which fractal patterns with characteristic tendrils were formed, migration zones were calculated as the average length of the two sides of a rectangle able to exactly frame each colony.

**CAS siderophore assay.** The determination of siderophores in liquid cultures was performed using the chrome azurol S (CAS) assay solution described by Schwyn and Neilands (40). Supernatants of *S. meliloti* cultures were mixed 1:1 with the CAS assay solution. After reaching equilibrium, the absorbance was measured at 630 nm.

## RESULTS

**ExpR promotes flagellum-independent surface spreading of *S. meliloti*.** Swimming motility tests performed with Rm1021 (*expR*) and Rm8530 (*expR<sup>+</sup>*) revealed the abilities of these strains to swim without significant differences between them (Fig. 1A), thereby confirming previously published results (2). The same strains were assayed for surface motility on 0.6% agar BM highlighting different phenotypes (Fig. 1B). Whereas macrocolonies formed by Rm1021 were dry and did not show signs of significant surface expansion after 3 days of incubation, those formed by Rm8530 were highly mucoid and clearly covered a larger surface area. However, neither the macroscopic appearance nor the slow translocation over the surface of BM shown by Rm8530 (ca. 0.04  $\mu$ m/s) was indicative of swarming motility. The two new Rm1021 derivative strains constructed in this study, QN1021 (*expR*) and 1021R (*expR<sup>+</sup>*), showed the same behavior as Rm1021 (*expR*) and Rm8530 (*expR<sup>+</sup>*), respectively. Bahlawane and coworkers described the surface expansion shown by their *S. meliloti expR<sup>+</sup>* strains as swarming based on the fact that Rm2011 *expR<sup>+</sup>* derivative strains defective in flagellum production (*flgE* and *visN* mutants) were nonmotile on semisolid BM (2). We tested the motility phenotype of three mutant derivative strains of Rm8530: Rm11601 (*expR<sup>+</sup> flaA flaB*), lacking functional flagellar filaments, 8530Vis (*expR<sup>+</sup> visN visR*), lacking the master regulator of flagellar, motility, and chemotaxis genes, and 8530Fg (*expR<sup>+</sup> flgE*), affected in the gene putatively coding for the flagellar hook protein. These three mutant strains were devoid of flagella (16) (data not shown) and consequently were incapable of swimming (Fig. 1A). On the contrary, on 0.6% agar BM, all three strains showed the same behavior as





**FIG 1** Role of ExpR in motility of *S. meliloti*. (A) Swimming test in Bromfield medium (0.3% agar). (B) Surface motility on semisolid Bromfield medium (0.6% agar). (C) Surface motility on semisolid MM (0.6% agar). The relevant genotype is indicated under the name of each strain. Pictures were taken 2 days (A), 3 days (B), or 20 h (C) after inoculation. Under each image, the mean and standard deviation of the migration zones (given in millimeters and measured as described in the text) obtained from at least nine measurements are indicated.

the flagellated parental strain Rm8530 (Fig. 1B). These results were in disagreement with the data presented by Bahlawane et al. in which nonflagellated *expR+* derivatives of the closely related strain Rm2011 were shown to be nonmotile under the same conditions. To investigate if the differences were due to strain-specific effects, the motility of Rm2011 (*expR*) and that of its derivatives Sm2B3001 (*expR+*),

Sm2B5005 (*expR+ flgE*), and Sm2B6005 (*expR+ visN*) were tested on 0.6% agar BM (not shown in Fig. 1). The behavior of Rm2011 and the *visN* derivative mutant strain Sm2B6005 was reproducible in all our assays and in agreement with our results: colonies formed by the *ExpR*-deficient strain Rm2011 were dry, whereas those formed by the nonflagellated *expR+* derivative strain Sm2B6005 were highly mu-

coid and spread over the surface of semisolid BM significantly more than colonies formed by Rm2011 ( $9.9 \pm 0.2$  mm versus  $5.4 \pm 0.2$  mm, respectively). On the contrary, an unstable mucoid phenotype was observed for strains 2B3001 (*expR*<sup>+</sup>) and 2B5005 (*expR*<sup>+</sup> *flgE*), leading to unreliable results. Therefore, we decided to construct two new Rm2011 derivative strains: 2011R (*expR*<sup>+</sup>) and 2011RFg (*expR*<sup>+</sup> *flgE*). As shown in Fig. 1B, the new strains behaved like Rm8530 (*expR*<sup>+</sup>) and 8530Fg (*expR*<sup>+</sup> *flgE*), respectively. Altogether, these data demonstrate that *S. meliloti* strains harboring a functional *expR* gene are able to spread on the surface of semisolid BM but that the mechanism used is not dependent on flagella and therefore cannot be described as swarming motility.

**ExpR is not required for swarming motility of *S. meliloti*.** When surface motility assays were performed on semisolid MM plates, surface translocation with characteristic tendrill formation could be observed for the ExpR-deficient strains Rm1021, QN1021, and Rm2011 by 14 to 20 h after inoculation (Fig. 1C). To corroborate that the surface motility shown by *S. meliloti* ExpR-deficient strains on semisolid MM was dependent on flagella, the motility phenotypes of 1021F (*expR* *flaA* *flaB*) and 2011m.E07 (*expR* *flgE*) were assayed and compared to those of their corresponding parental strains Rm1021 and Rm2011, respectively. As expected for nonflagellated bacteria, 1021F and 2011m.E07 were nonmotile in swimming assays performed in BM containing 0.3% agar (Fig. 1A). Likewise, as expected for ExpR-deficient strains, they did not spread on 0.6% BM (Fig. 1B). On semisolid MM, surface translocation of these two strains was severely affected compared to that of their parental strains although not completely abolished, as is the case for 2011rhbA62 and 1021rhbA, mutant strains unable to produce the siderophore rhizobactin 1021 that are derived from Rm2011 and Rm1021, respectively (Fig. 1C) (32). This result demonstrates that ExpR-deficient *S. meliloti* strains are able to show flagellum-driven surface translocation (i.e., swarming motility) on semisolid MM, and therefore, we can conclude that ExpR is not required for swarming. The minor surface spreading shown by nonflagellated ExpR-deficient strains reveals the existence of a second type of surface motility which is not dependent on flagellar activity. This ExpR- and flagellum-independent surface motility seems to be regulated by the nutrient composition of the medium since it is manifested only on semisolid MM and not in semisolid BM. The fact that gene mutations (*rhb*) and environmental conditions (high iron) which block the synthesis of the siderophore rhizobactin 1021 render *S. meliloti* Rm1021/Rm2011 completely nonmotile on semisolid MM (Fig. 1C, 1021rhbA) (32) suggests that rhizobactin 1021 plays a role in both the flagellum-driven and the flagellum-independent surface motilities shown by ExpR-deficient *S. meliloti* strains. CAS assays performed with supernatants of Rm1021/Rm2011 cultures grown in BM revealed a lack of siderophore production (data not shown), which could explain the absence of surface motility on semisolid BM by these ExpR-deficient strains.

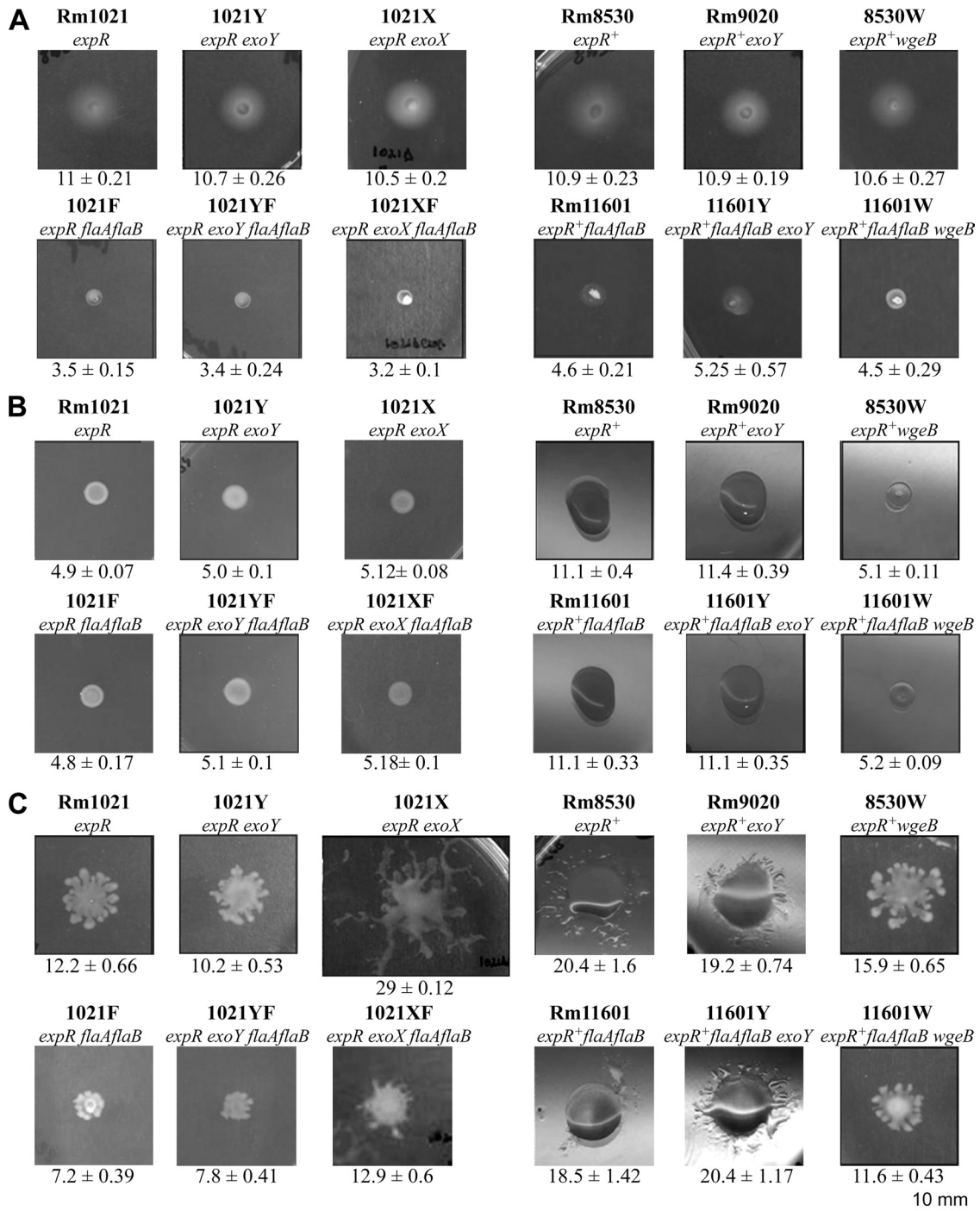
Surface motility assays on semisolid MM were also performed for *S. meliloti* strains harboring a functional *expR* gene (Fig. 1C). In contrast to the behavior shown by Rm1021/QN1021/Rm2011, colonies formed by 1021R/Rm8530/2011R (*expR*<sup>+</sup> strains) were highly mucoid and showed smooth borders, although some tendrills could also be observed. Notably, the *expR*<sup>+</sup> strains spread extensively over the surface, covering an area which was almost

twice as large as the area colonized by ExpR-deficient strains, suggesting that ExpR promotes surface translocation not only on semisolid BM but also on semisolid MM. However, in contrast to *expR* mutant strains, the surface spreading displayed by Rm8530 was not significantly reduced in the absence of flagella, as revealed by the phenotypes exhibited by Rm11601 (*expR*<sup>+</sup> *flaA* *flaB*), 8530Vis (*expR*<sup>+</sup> *visN* *visR*), and 8530Fg (*expR*<sup>+</sup> *flgE*) (Fig. 1C). Similar behavior was observed for 2011R and its nonflagellated derivative strain 2011RFg. These results indicate that, as on semisolid BM, the surface translocation shown by *expR*<sup>+</sup> strains of *S. meliloti* on semisolid MM is not dependent on flagellar activity and therefore cannot be described as swarming.

**EPS II is not required for swarming and promotes sliding motility in *S. meliloti*.** The observed correlation between mucoidy and flagellum-independent surface motility that was shown by *expR*<sup>+</sup> strains, together with the role assigned to ExpR in EPS I and EPS II synthesis (21), prompted us to investigate the function of these exopolysaccharides in the surface spreading exhibited by *S. meliloti*.

It is known that ExpR-deficient strains of *S. meliloti*, such as Rm1021, do not produce EPS II at detectable levels unless they are grown under low-phosphate conditions (29). Nevertheless, they are able to show swarming motility, as we have demonstrated in this and previous works (32), indicating that EPS II is not required for this flagellum-driven surface translocation. To investigate the role of EPS II in the motility of *S. meliloti* *expR*<sup>+</sup> strains, we constructed *wgeB* (formerly *expE2*) mutants impaired in a glycosyl transferase involved in EPS II synthesis (3). Strain 8530W (*expR*<sup>+</sup> *wgeB*) and nonflagellated 11601W (*expR*<sup>+</sup> *flaA* *flaB* *wgeB*) showed a nonmucoid phenotype in different media, as expected for *S. meliloti* strains unable to synthesize EPS II. Moreover, no relevant differences in swimming rings were detected between these strains and their corresponding parental strains (Rm8530 and Rm11601, respectively) (Fig. 2A), suggesting that EPS II plays no role in swimming motility. However, in contrast to their parental strains and all the *expR*<sup>+</sup> strains tested in this work, 8530W and 11601W did not spread over the surface of 0.6% BM, displaying the same phenotype as ExpR-deficient strains (Fig. 2B). 8530W and 1161W did not show defects in growth in liquid BM (data not shown). Thus, these results clearly demonstrate that the flagellum-independent surface translocation shown by ExpR strains of *S. meliloti* on semisolid BM is absolutely dependent on the production of EPS II. Therefore, this mode of translocation is most akin to sliding motility, whereby the production of EPS II promotes passive movement of cells across the agar surface.

The *wgeB* mutation also led to a significant reduction (23% in the case of flagellated Rm8530 and 37% for nonflagellated Rm11601) in the surface motility shown by *expR*<sup>+</sup> strains of *S. meliloti* on semisolid MM (Fig. 2C). No differences in growth rates were detected in MM broth between the two *wgeB* mutants and their corresponding parental strains (data not shown). Therefore, EPS II also contributes to flagellum-independent surface translocation or sliding, which seems to be the predominant mode of translocation of *expR*<sup>+</sup> strains, on MM. Interestingly, when EPS II production is blocked, these strains exhibit swarming motility, manifested by the ca. 4.25-mm difference in surface spreading displayed between 8530W (*expR*<sup>+</sup> *wgeB*) (15.9 mm) and 11601W (*expR*<sup>+</sup> *flaA* *flaB* *wgeB*) (11.6 mm) which, indeed, is very similar to the difference in surface spreading (5 mm) shown by Rm1021 (*expR*) (12.2 mm) and 1021F (*expR*, *flaA* *flaB*) (7.2 mm). These



**FIG 2** Role of exopolysaccharides EPS I and EPS II in motility of *S. meliloti*. (A) Swimming test in Bromfield medium (0.3% agar). (B) Surface motility on semisolid Bromfield medium (0.6% agar). (C) Surface motility on semisolid MM (0.6% agar). The relevant genotype is indicated under the name of each strain. Pictures were taken 2 days (A), 3 days (B), or 20 h (C) after inoculation. Under each image, the mean and standard deviation of the migration zones (given in millimeters and measured as described in the text) obtained from at least nine measurements are indicated.

results indicate that as in *expR* mutants, EPS II is not essential for the swarming motility of *expR<sup>+</sup>* strains. The sliding motility promoted by EPS II allows for a larger surface colonization than the swarming motility exhibited by the same strain when EPS II synthesis is blocked. This makes it difficult to determine if swarming and sliding coexist in *expR<sup>+</sup>* strains or if, alternatively, EPS II

production inhibits flagellum-driven surface motility. In either case, our data revealed that once EPS II production is impeded, *ExpR* does not significantly influence swarming motility in *S. meliloti*.

As is the case for the nonflagellated strain 1021F (*expR flaAflaB*), the ability of 11601W (*expR<sup>+</sup> flaAflaB wgeB*) to move over



the surface of semisolid MM was not abolished. Indeed, the flagellum-independent surface translocation shown by 11601W seemed to be enhanced compared to that shown by 1021F. This behavior could be the result of the better growth rate shown by 1161W in liquid MM compared to that of 1021F (data not shown). Regardless of the effect of growth on surface translocation, our results suggest that an ExpR-controlled factor might play a role in flagellum-independent surface translocation. It is tempting to speculate that this factor might be rhizobactin 1021 based on the role played by this siderophore in surface motility of ExpR-deficient strains and on the reported transcriptomic data which revealed higher expression of the *rhxA* gene (encoding the AraC-like regulator, which positively regulates the production and transport of rhizobactin 1021) in Rm8530 (*expR*<sup>+</sup>) than in Rm1021 (*expR*) (21). However, this hypothesis has not been investigated here.

**Overproduction of EPS I promotes both sliding and swarming motilities in ExpR-deficient *S. meliloti* strains.** To investigate the role of EPS I in the different types of motility shown by *S. meliloti*, several *exoY* mutants lacking a sugar transferase essential in EPS I synthesis (30) were generated. As shown in Fig. 2, under the three conditions tested, the phenotypes exhibited by the *exoY* mutants 1021Y (*expR* *exoY*), 1021YF (*expR* *exoY* *flaA* *flaB*), Rm9020 (*expR*<sup>+</sup> *exoY*), and 11601Y (*expR*<sup>+</sup> *flaA* *flaB* *exoY*) were similar to those of their corresponding isogenic strains harboring a functional *exoY* locus (Rm1021, 1021F, Rm8530, and Rm11601, respectively). These results demonstrate that the production of normal amounts of EPS I does not play a significant role in either swimming, swarming (observed in ExpR-deficient strains on semisolid MM), or flagellum-independent surface spreading (shown by *expR*<sup>+</sup> strains on both semisolid BM and MM and by ExpR-deficient strains on semisolid MM).

We decided to test if an increased production of EPS I could have an effect on motility similar to the effect caused by the large amount of EPS II produced by *expR*<sup>+</sup> strains. The overproduction of EPS I was achieved by deleting most of the coding sequence of the *exoX* gene, whose disruption has been shown to cause overproduction of low-molecular-weight EPS I in *S. meliloti* (36). The gene deletion eliminates essential amino acids required for the inhibitory effect of ExoX on exopolysaccharide synthesis, an effect that it is thought to occur posttranslationally in a mechanism in which the stoichiometry with ExoY is important.

The *exoX* derivative mutant strains 1021X and 1021XF were more mucoid on MM plates than the corresponding parental strains Rm1021 and 1021F. Moreover, the higher fluorescence shown under long-wave UV light by 1021X and 1021XF, grown on TY plates supplemented with the fluorescent dye calcofluor white, compared to that by their parental strains confirmed EPS I overproduction (data not shown). Motility tests performed with these strains revealed no significant differences in swimming (Fig. 2A). In addition, no surface translocation associated with the *exoX* mutation could be observed on semisolid BM (Fig. 2B). Interestingly, on semisolid MM, 1021X (*expR* *exoX*), which showed a growth rate in liquid MM that was similar to that of the parental strain, exhibited the largest surface translocation of all the strains tested in this work, colonizing a surface area which was 2.4-fold wider than that of the parental strain Rm1021 (Fig. 2C). This movement was strongly diminished in the absence of flagella, as revealed by the behavior of 1021XF (*expR* *exoX* *flaA* *flaB*), demonstrating that 1021X shows swarming motility. Furthermore, the flagellum-promoted surface spreading exhibited by 1021X (*expR* *exoX*) (ca. 16

mm) was approximately 3-fold larger than the flagellum-driven surface translocation shown by Rm1021 (*expR*) (ca. 5 mm) (Fig. 2C), indicating that overproduction of EPS I promotes swarming motility. On the other hand, EPS I overproduction also promotes flagellum-independent surface translocation on MM, as revealed by the larger area colonized by 1021XF (*expR* *exoX* *flaA* *flaB*) compared to the surface area colonized by 1021F (*expR* *flaA* *flaB*) (Fig. 2C). Introducing an *exoY* mutation into the 1021X strain led to phenotypes (mucoidy, calcofluor brightness, and surface motility) that were similar to those shown by Rm1021 (*expR*) and 1021Y (*expR* *exoY*) (data not shown), demonstrating that the overproduction of EPS I was the only cause of the observed effects in *exoX* mutants.

## DISCUSSION

This work was aimed at solving the existing discrepancies concerning the role of the LuxR-type regulator ExpR in the swarming motility of *S. meliloti*. Two different groups reported independently that swarming of *S. meliloti* depends on the presence of a functional *expR* locus (2, 13). However, we recently reported that strains Rm1021 and Rm2011, both known to have a disrupted copy of *expR*, are able to swarm on semisolid medium (32). We have reexamined the role played by ExpR by using different mutants in different genetic backgrounds and assaying their motility phenotypes under the experimental conditions described in the contradicting publications.

The new data showed that although ExpR-deficient strains do not display surface translocation on semisolid BM, as reported by Bahlawane et al. (2), they exhibit flagellum-driven surface translocation on semisolid MM. Therefore, we can conclude that ExpR is not essential for swarming motility. Moreover, it became clear that, as previously reported for a *S. meliloti* *fadD* mutant (42), the swarming motility of ExpR-deficient strains is greatly influenced by the nutrient composition of the medium. Besides flagella, the production of the siderophore rhizobactin 1021, which requires the presence of low iron concentrations in the medium, is the only factor known up to now to play an essential role in the swarming motility of ExpR-deficient strains.

In addition to demonstrating the dispensability of ExpR for swarming motility in *S. meliloti*, this study has unveiled the existence in *S. meliloti* of an additional mode of surface translocation which does not require flagellar activity. This type of movement was especially noticeable in strains harboring a functional *expR* locus in both semisolid BM and MM. By using up to 4 different nonflagellated derivative mutants (including those used in the study by Bahlawane et al.), we clearly demonstrated that the surface spreading shown by *expR*<sup>+</sup> strains on semisolid medium was not significantly diminished by the absence of flagella and therefore cannot be considered swarming. However, when synthesis of galactoglucan (EPS II) was blocked by generating *wgeB* mutations, surface spreading of *expR*<sup>+</sup> strains was completely abolished on BM and significantly reduced on MM. Considering these data, the surface translocation shown by *expR*<sup>+</sup> strains of *S. meliloti* is most akin to sliding motility (18, 19), whereby the production of EPS II promotes passive movement of cells across the agar surface.

To the best of our knowledge, this work represents the first report on sliding motility in *Rhizobium*. Sliding or spreading by expansion has been described for a diverse group of bacteria, such as mycobacteria, *Bacillus subtilis*, *Vibrio cholerae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Legionella pneumophila* (1, 5,

9, 27, 31, 43), in which a strong correlation between sliding and the production of surfactants has been established. For example, the production of rhamnolipids in *Pseudomonas*, the lipopeptides surfactin and serrawettin in *Bacillus* and *Serratia*, respectively, or a surfactant-like material in *Legionella* facilitates flagellum-independent surface translocation in these bacteria. Most of these surfactants also play a crucial role in swarming motility (reviewed in references 8, 23, and 45). We are not aware of the possible surfactant properties of the galactoglucan produced by *S. meliloti*, and we can only speculate about its role in sliding motility. It is possible that the high levels of EPS II excreted by *expR*<sup>+</sup> strains serve either as a hydrated milieu that gives sufficient moisture to facilitate the spreading of the colony or as a lubricant that reduces friction between cells and surfaces. In any case, and in contrast to surfactants such as rhamnolipids, surfactin, or serrawettin, EPS II is not essential for the swarming motility of *S. meliloti*, as indicated by the flagellum-dependent translocation shown by EPS II-defective strains, regardless of whether they have a functional ExpR regulator.

In addition to swarming and EPS II-promoted sliding motility, *S. meliloti* strains can also spread over surfaces, although to a lesser extent, using a flagellum- and EPS II-independent type of motility. In *ExpR*-deficient strains, this motility relies on the production of the rhizobactin 1021 siderophore, since abolishment of its synthesis renders Rm1021/Rm2011 strains completely nonmotile. Therefore, rhizobactin 1021 plays a crucial role in both swarming and flagellum-independent surface translocation shown by *expR* strains of *S. meliloti*. We recently observed that purified rhizobactin 1021 shows drop collapse activity (our unpublished results), a property probably conferred by the presence of the long-chain fatty acid (E)-2-decenoic acid in its chemical structure. Thus, it is very probable that, as reported for other surfactants which play roles in swarming and sliding motilities, rhizobactin 1021 contributes to the surface migration of *S. meliloti* by acting as a wetting agent. We have not demonstrated in this work if rhizobactin 1021 also accounts for the flagellum- and EPS II-independent surface translocation exhibited by *expR*<sup>+</sup> strains on semisolid MM, although this possibility is very likely.

The results presented in this work also provide further insights into additional factors contributing to surface translocation in *S. meliloti*. The phenotype exhibited by *exoX* derivative mutants of Rm1021 demonstrates that the overproduction of EPS I, but not the production of normal amounts of this EPS, facilitates both sliding and swarming motilities. Extracellular polysaccharides have been involved in surface translocation in other bacteria. Thus, the acidic capsular polysaccharide produced by *Proteus mirabilis* that is known as colony migration factor (Cmf), which is an important component of the extracellular matrix that surrounds swarmer cells, plays a key role in swarming motility by reducing surface friction during translocation (17). A similar role could be attributed to EPS I but only at high levels of production.

This work has unveiled the unexpected complexity of surface translocation in *S. meliloti*, raising questions that require further investigation. It is clear that EPS II-dependent sliding is the most relevant type of surface translocation displayed by *expR*<sup>+</sup> strains of *S. meliloti*, allowing these bacteria to colonize surfaces more efficiently than strains displaying only swarming motility. Whether swarming and sliding take place at the same time in *expR*<sup>+</sup> strains or whether EPS II inhibits swarming motility still remains unclear. Furthermore, although we show here that *ExpR* is not required and does not signif-

icantly influence swarming motility in *S. meliloti*, we cannot rule out the possibility of population density regulation of swarming motility in this bacterium. Therefore, efforts should be continued to identify and characterize other regulators and components which play key roles in sliding and/or swarming. Another interesting question to be solved is the role these types of surface motilities play in the different lifestyles of *Rhizobium* spp. Whereas the role of swarming motility in the establishment of the *Rhizobium*-legume symbiosis is still unclear, sliding motility may allow *S. meliloti* to colonize surfaces under conditions where flagellar expression is downregulated, for instance, at high cell population densities and during the invasion process. In line with this, a collective sliding movement of bacteria toward the infection thread tip has been proposed to contribute to colonization of the thread (11). The biological significance of the ability to slide or swarm in *Rhizobium*-legume symbiosis remains to be elucidated.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BIO2007-62988 and BIO2010-18005 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), CVI 03541 from the Junta de Andalucía (Spain), and FEDER funds. J.N. and L.B.R. were supported by grants from the Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (Junta de Andalucía, Spain).

We are grateful to Juan E. González, Anke Becker, and Birgit Scharf for providing several *S. meliloti* strains.

## REFERENCES

- Agustí G, Astola O, Rodríguez-Güell E, Julián E, Luquin M. 2008. Surface spreading motility shown by a group of phylogenetically related, rapidly growing pigmented mycobacteria suggests that motility is a common property of mycobacterial species but is restricted to smooth colonies. *J. Bacteriol.* 190:6894–6902.
- Bahlawane C, McIntosh M, Krol E, Becker A. 2008. *Sinorhizobium meliloti* regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:1498–1509.
- Becker A, et al. 1997. The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: genetic organization and properties of the encoded gene products. *J. Bacteriol.* 179:1375–1384.
- Beringer JE. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188–198.
- Brown II, Häse CC. 2001. Flagellum-independent surface migration of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:3784–3790.
- Casse F, Boucher C, Julliot JS, Michel M, Dénarié J. 1979. Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose-gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.* 113:229–242.
- Daniels R, et al. 2006. Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:14965–14970.
- Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:261–289.
- Fall R, Kearns DB, Nguyen T. 2006. A defined medium to investigate sliding motility in a *Bacillus subtilis* flagella-less mutant. *BMC Microbiol.* 6:31.
- Finan TM, et al. 1984. General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 159:120–124.
- Fournier J, et al. 2008. Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiol.* 148:1985–1995.
- Fraser GM, Hughes C. 1999. Swarming motility. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:630–635.
- Gao M, et al. 2005. *sinI*- and *expR*-dependent quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 187:7931–7944.
- Glazebrook J, Walker GC. 1989. A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Cell* 56:661–672.
- Glazebrook J, Walker GC. 1991. Genetic techniques in *Rhizobium meliloti*. *Methods Enzymol.* 204:398–418.
- Gurich N, González JE. 2009. Role of quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J. Bacteriol.* 191:4372–4382.

17. Gygi D, et al. 1995. A cell-surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.* 17:1167–1175.
18. Harshey RM. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:249–273.
19. Heinrichsen J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36:478–503.
20. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, Pullen JK, Pease LR. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77:51–59.
21. Hoang HH, Becker A, González JE. 2004. The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J. Bacteriol.* 186:5460–5472.
22. Hoang HH, Gurich N, González JE. 2008. Regulation of motility by the ExpR/Sin quorum-sensing system in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 190:861–871.
23. Kearns DB. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:634–644.
24. Kim W, Surette MG. 2004. Metabolic differentiation in actively swarming *Salmonella*. *Mol. Microbiol.* 54:702–714.
25. Lynch D, et al. 2001. Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 183:2576–2585.
26. Marketon MM, Gronquist MR, Eberhard A, González JE. 2002. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* locus and the production of novel *N*-acyl homoserine lactones. *J. Bacteriol.* 184:5686–5695.
27. Matsuyama T, Bhasin A, Harshey RM. 1995. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J. Bacteriol.* 177:987–991.
28. Meade HM, Signer ER. 1977. Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74:2076–2078.
29. Mendrygal KE, González JE. 2000. Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 182:599–606.
30. Müller P, et al. 1993. Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *exoYFQ* operon: ExoY is homologous to sugar transferases and ExoQ represents a transmembrane protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6:55–65.
31. Murray TS, Kazmierczak BI. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* exhibits sliding motility in the absence of type IV pili and flagella. *J. Bacteriol.* 190:2700–2708.
32. Nogales J, et al. 2010. Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti* *fadD* mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics* 11:157.
33. Overhage J, Bains M, Brazas MD, Hancock RE. 2008. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* 190:2671–2679.
34. Pellock BJ, Teplitski M, Boinay RP, Bauer WD, Walker GC. 2002. A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 184:5067–5076.
35. Pobigaylo N, et al. 2006. Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:4329–4337.
36. Reed JW, Capage M, Walker GC. 1991. *Rhizobium meliloti* *exoG* and *exoJ* mutations affect the ExoX-ExoY system for modulation of exopolysaccharide production. *J. Bacteriol.* 173:3776–3788.
37. Robertsen BK, Aiman P, Darwill AG, Mcneil M, Albersheim P. 1981. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* 67:389–400.
38. Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
39. Schäfer A, et al. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69–73.
40. Schwyn B, Neilands JB. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160:47–56.
41. Simon R, Priefer U, Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nat. Biotechnol.* 1:784–791.
42. Soto MJ, Fernández-Pascual M, Sanjuán J, Olivares J. 2002. A *fadD* mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. *Mol. Microbiol.* 43:371–382.
43. Stewart CR, Rossier O, Cianciotto NP. 2009. Surface translocation by *Legionella pneumophila*: a form of sliding motility that is dependent upon type II protein secretion. *J. Bacteriol.* 191:1537–1546.
44. Tambalo DD, Yost CK, Hynes MF. 2010. Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 307:165–174.
45. Verstraeten N, et al. 2008. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* 16:496–506.
46. Wang Q, Frye JG, McClelland M, Harshey RM. 2004. Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Mol. Microbiol.* 52:169–187.



