

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Estación Experimental del Zaidín



Universidad de Granada



**Análisis genómico y funcional de la interacción Planta-
Pseudomonas putida KT2440 en la rizosfera:
colonización y resistencia sistémica**

Tesis doctoral

Miguel Ángel Matilla Vázquez

2009

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Miguel Ángel Matilla Vázquez
D.L.: GR 3913-2009
ISBN: 978-84-692-7860-4

**Análisis genómico y funcional de la interacción planta-
Pseudomonas putida KR2440 en la rizosfera: colonización y
resistencia sistémica**

Memoria que presenta el Licenciado
en Biología Miguel Ángel Matilla Vázquez
para aspirar al Título de Doctor

Fdo.: Miguel Ángel Matilla Vázquez

Vº Bº del Director

Vº Bº de la Directora

Fdo.: Juan Luis Ramos Martín
Doctor en Biología
Profesor de Investigación del C.S.I.C.

Fdo.: María Isabel Ramos González
Doctora en Biología
Científico Titular del C.S.I.C.

EEZ-CSIC/Universidad de Granada

2009

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Protección Ambiental de la Estación Experimental del Zaidín, perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.), Granada.

A mis Padres y hermanos

A Amalia

AGRADECIMIENTOS

Una Tesis Doctoral es una carrera de fondo que sin el avituallamiento necesario, en forma de confianza, apoyo y amistad habría sido imposible alcanzar la meta. Como muestra de gratitud, es mi obligación dar las gracias:

Al Profesor Juan Luis Ramos, director del Grupo de Degradación de Tóxicos Orgánicos de la Estación Experimental del Zaidín y codirector de esta Tesis Doctoral, por haberme dado la oportunidad de dar mis primeros pasos en el mundo científico en su Grupo de Investigación. Gracias por tu calidad científica, increíble capacidad de trabajo y por saber encontrar siempre la parte positiva de las cosas.

A la Dra. María Isabel Ramos, codirectora de esta Tesis Doctoral y seguidora día a día de mi trabajo en el laboratorio. Tu sacrificio, rigurosidad y formación científica son dignos de admiración. Gracias por tu apoyo y por haber tenido siempre un momento para hablar de ciencia. ¡Por fin puedes volver a disfrutar de tu despacho al completo!

Gracias al Ministerio de Educación y Ciencia por la concesión de la beca FPU que ha permitido la realización de esta Tesis.

Al Dr. Peter Bakker, por acogerme en su laboratorio en la Universidad de Utrecht. Esos tres meses me han permitido profundizar en la parte “vegetal” de la interacción.

Al Dr. Manuel Espinosa-Urgel, por su ayuda y consejos siempre que lo he necesitado. Gracias a los Drs. Tino Krell, Pieter Van Dillewijn y Rolf Wittich, y a las Dras. Silvia Marqués, Estrella Duque y Ana Segura, tod@s ellos han puesto su granito de arena en este trabajo. A Chechu, una fuente de conocimiento y mi “padre” con los *microarrays*.

A todos mis compañer@s del laboratorio 1.1. (ahora bifurcado al laboratorio 1.3.) que me han aguantado todo este tiempo. María (la más acérrima defensora de la patria “Zubietica”) y Marichu (tu “mala follá” al final no era para tanto). Con vuestra ayuda todo ha sido mucho más fácil. Gracias por haberme hecho saber que puedo contar con vosotras para cualquier cosa. Regina, gracias por tu generosidad y por tener siempre un ratito para los demás. A Saray, energía y simpatía en estado puro. Ha sido un verdadero placer compartir con vosotras parte de este camino. A Maribel “chica”, mi único apoyo madridista en el laboratorio. Fátima y Marta, os deseo mucha suerte en el futuro.

A Andreas y Carmen, ¡no tengo palabras! Han sido muchas cosas las que hemos vivido juntos y sé que tengo en vosotros unos verdaderos amigos. Andreas, tenemos que recuperar el tiempo perdido y hacer un maratón de “shawarmas” y otro fotográfico. Carmela, ¡no creas que te vas a librar tan fácilmente de mis sustos! Echaré

menos las barbacoas, las escapadas a la playa y los fines de semana de tapas, conciertos y “pachanguero”. Gracias por vuestra complicidad.

A Chema y Paola, mi salmantino y colombiana preferidos. Chema, ¡el próximo partido de tenis lo ganó yo! Paola, nunca pierdas esa eterna sonrisa. Gracias a los dos por vuestro cariño y amistad. No olvidéis que está pendiente ese viaje por Galicia.

A Alejo, embajador de Colombia en la EEZ. Siempre has sabido sacar una sonrisa en el momento más necesario. ¡Ah!, aunque lo ocultes, en el fondo sé que eres un verdadero “gachupino”. Patri Bernal, se te echa de menos (a tus albóndigas también). A Guillem, compañero de “aventuras” en Holanda; al final, no estuvo mal del todo, ¿verdad?

Quisiera recordar también a toda la gente del laboratorio, sin olvidarme de Vanina, Antonio Jesús, Jesús Lacal, Jesús de la Torre, Ali, Gloria, Nené, Patri Marín o Patri Godoy. Siempre me habéis tendido la mano desde el primer día. A tod@s vosotros, mil gracias. Además, me gustaría destacar la labor de Mari Angustias y de todas aquellas personas que han hecho el trabajo en el laboratorio mucho más llevadero.

Como no, agradecer a mis padres y hermanos, por todo su sacrificio y por haberme hecho sentir que la distancia no siempre es una barrera. Siempre habéis estado a mi lado para ayudarme, aconsejarme y escucharme. Nada de esto habría sido posible sin vosotros. Agradecer también el cariño y el interés de mi abuela Fina y de mis tíos Joss y Susana.

A José María y Ana, mis padres adoptivos en Granada, por haberme hecho sentir como en casa. Gracias también a Eva y Ana “hija”; fue un placer tener un par de nuevas hermanas.

A Mitch, Antonio, Emilio, Carla, Carlota, Lucía, Mar, Cocó, Fernando y toda mi gente de Santiago de Compostela y Brión. Tod@s habéis sido un gran apoyo. Es una gran alegría saber que seguís estando ahí. Gracias por vuestra amistad.

Por supuesto, mención especial a mi Amali. Estoy muy contento de que nuestros caminos se hayan cruzado y de haberte conocido. Tu vitalidad, alegría y cariño me ha permitido recobrar la energía y el entusiasmo que en ocasiones me ha faltado. Gracias por estar a mi lado y por quererme.

ÍNDICE

	<u>Pág.</u>
ABREVIATURAS	xvii
APÉNDICE	xv
Índice de figuras	xix
Índice de tablas	xxv
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. La Rizosfera y los exudados radiculares	3
1.1. Mecanismos de exudación radicular	4
1.2. Exudación radicular y efecto rizosfera	7
2. Beneficios de la interacción planta-bacteria en la rizosfera	9
3. Características bacterianas diferenciales de la vida en superficie	14
4. Colonización bacteriana de la rizosfera	17
4.1. Utilización de nutrientes de los ERs	19
4.2. Importancia de la motilidad para la colonización de la rizosfera	20
4.3. Quimiotaxis (QT) y colonización de superficies radiculares	22
4.4. Implicación del <i>quorum-sensing</i>	25
5. Tecnologías empleadas para el estudio de la expresión génica en la rizosfera	26
5.1. Expresión génica en la rizosfera	27
6. Metabolismo del di-GMPc en la célula bacteriana	31
6.1. Fenotipos regulados por di-GMPc	35
6.2. Regulación de los niveles intracelulares de di-GMPc	38
6.3. Efectores celulares en las vías de señalización de di-GMPc	41
II. OBJETIVOS	43

	<u>Pág.</u>
III. RESULTADOS	47
Capítulo 1.	49
Capítulo 2.	65
Capítulo 3.	75
Capítulo 4.	87
IV. DISCUSIÓN GENERAL	139
V. MATERIAL SUPLEMENTARIO	163
Anexo al Capítulo 1.	165
Anexo al Capítulo 2.	170
Anexo al Capítulo 3.	171
Anexo al Capítulo 4.	179
VI. CONCLUSIONES	189
VII. BIBLIOGRAFÍA	193

APÉNDICE

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr	ADN ribosómico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ATP	Adenosina trifosfato
BP(s)	Biopelícula(s) o "biofilm(s)"
C-terminal	Extremo carboxilo
CAA	Casaminoácidos
Cap.	Capítulo
DGC	Diguanilato ciclasa
di-GMPc	bis-(3',5')-monofosfato de guanosina cíclico
DO	Densidad óptica (medida de turbidez)
EAL	Motivo Glu-Ala-Leu
Ej.	Ejemplo
EPS	Exopolisacáridos
ER(s)	Exudado(s) radicular(es)
ET	Etileno
Fig.	Figura
GGDEF	Motivo Gly-Gly-Asp-Glu-Phe
GFP	Proteína de fluorescencia verde (del inglés, " <u>G</u> reen <u>F</u> luorescence <u>P</u> rotein")
GMP	Guanosina monofosfato
GTP	Guanosina trifosfato
HD-GYP	Motivo His-Asp-Gly-Tyr-Pro
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (del inglés, " <u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> romatography")
HSL(s)	Homoserín-lactona(s)
HTH	Motivo hélice-giro-hélice (del inglés, " <u>H</u> elix- <u>T</u> urn- <u>H</u> elix")
ISR	Resistencia Sistémica inducida (del inglés, " <u>I</u> nduced <u>S</u> ystemic <u>R</u> esistance")
IVET	Tecnología de expresión "in vivo" (del inglés, " <u>I</u> n <u>V</u> ivo <u>E</u> xpression <u>T</u> echnology")
JA	Ácido jasmónico
LB	Medio de cultivo <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
LPS	Lipopolisacáridos
Mat. sup.	Material suplementario
N-Terminal	Extremo amino
PAS	del inglés (<u>P</u> ar- <u>A</u> RNNT- <u>S</u> im)
PDE	Fosfodiesterasa
PG	Medio Peptona-Glucosa
pGpG	5'-fosfoguanilil (3'-5')-guanosina
PGPR(s)	Rizobacteria(s) promotora(s) del crecimiento (del inglés, " <u>P</u> lant <u>G</u> rowth <u>P</u> romoting <u>R</u> hizobacteria")
PR	Proteínas relacionadas con la patogénesis (del inglés, " <u>P</u> athogenesis <u>R</u> elated proteins")
QS	"Quorum-sensing"
QT	Quimiotaxis
REC	Dominio N-terminal de los reguladores de respuesta (del inglés, "cheY-homologous receiver domain")
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés, "Reactive Oxygen Species")

rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa
RR	Regulador de respuesta
RxxD	Motivo Arg-(x-x)-Asp
<i>rup</i>	Gen inducido transcripcionalmente en la rizosfera (del inglés, "rhizosphere <u>up</u> -regulated")
SA	Ácido salicílico
SAR	Resistencia sistémica adquirida (del inglés, "Systemic Acquired Resistance")
UFC	Unidad formadora de colonia
UV	Ultravioleta
<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas campestris pv. campestris</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>INTRODUCCIÓN</u>	<u>Pág.</u>
Figura 1. Esquema simplificado de una raíz principal.	3
Figura 2. Mecanismos implicados en la exudación radicular.	7
Figura 3. Antibiosis sobre <i>Bacillus subtilis</i> ejercida por el sideróforo pioverdina de <i>Pseudomonas putida</i> KT2440.	11
Figura 4. Mecanismo de transducción de señal en ISR y SAR.	13
Figura 5. Esquema del proceso de formación de biopelículas en superficies abióticas.	15
Figura 6. Microfotografías de fluorescencia mostrando la formación de biopelículas en raíces de <i>Arabidopsis</i> colonizadas por <i>Paenibacillus polymyxa</i> .	17
Figura 7. Metabolismo y fenotipos regulados por di-GMPc.	33
Figura 8. Modelo de la concentración intracelular de di-GMPc durante la formación de una biopelícula.	38
<u>RESULTADOS</u>	<u>Pág.</u>
<u>Capítulo 1</u>	
Figura 1. Perfil de expresión génica bacteriana en la rizosfera	56
Figura 2. Diagramas de Venn mostrando el solapamiento de genes con expresión diferencial en la rizosfera en las tres condiciones experimentales control	57
Figura 3. Eficiencia colonizadora de la rizosfera por diferentes mutantes de <i>P. putida</i> KT2440 en competición con la cepa silvestre KT2440RTn7-Sm	59
Figura 4. Esquema que presenta las funciones bacterianas inducidas durante la interacción planta- <i>P. putida</i> KT2440 en la rizosfera.	60

<u>Capítulo 2</u>	Pág.
Figura 1. Desencadenamiento de Resistencia Sistémica Inducida (ISR) por KT2440 en diferentes genotipos de <i>Arabidopsis thaliana</i> frente a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.	69
Figura 2. Inducción de Resistencia Sistémica Inducida (ISR) por mutantes en genes <i>rup</i> frente a la infección de <i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0 por <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.	70
Figura 3. Colonización de la rizosfera de <i>A. thaliana</i> por la cepa silvestre de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes en genes <i>rup</i> .	70
Figura 4. Efecto de <i>P. putida</i> KT2440 sobre el perfil de exudación de plantas de <i>A. thaliana</i> .	71
Figura 5. Perfil de exudación de plantas de <i>A.thaliana</i> en presencia de la cepa silvestre <i>P. putida</i> KT2440 y un mutante en PP2561 defectivo en el desencadenamiento de ISR.	72
 <u>Capítulo 3</u>	
Figura 1. Patrón de motilidad en superficie de <i>P. putida</i> KT2440 a diferentes temperaturas.	78
Figura 2. Fotografías de microscopía de transmisión de electrones con tinción negativa.	78
Figura 3. Papel de distintos apéndices de <i>P. putida</i> KT2440 en la motilidad en superficie.	79
Figura 4. Complementación génica del mutante <i>ppsD</i> de <i>P. putida</i> defectivo en motilidad tipo "swarming".	81
Figura 5. Restauración de la motilidad tipo "swarming" en el mutante <i>ppsD</i> mediante la adición de pioverdina purificada.	82
Figura 6. Efecto del ión férrico sobre la motilidad tipo "swarming" de <i>P. putida</i> KT2440R y los mutantes <i>ppsD</i> y <i>fpvA</i> .	83

Capítulo 4	Pág.
Figura 1. El promotor $P_{rup4959}$ está activo in situ en la rizosfera de <i>Zea mays</i> .	128
Figura 2. Influencia del medio de cultivo y la fase de crecimiento sobre la transcripción del gen <i>rup4959</i> .	128
Figura 3. Inducción transcripcional de <i>rup4959</i> y <i>rpoS</i> en presencia de exudados radiculares de <i>Zea mays</i> .	129
Figura 4. La transcripción de <i>rup4959</i> es dependiente de σ^s .	129
Figura 5. La tensión parcial de oxígeno regula la transcripción de <i>rup4959</i> .	130
Figura 6. Las condiciones de aireación regulan la transcripción de <i>rpoS</i> y de otros genes de su regulón.	130
Figura 7. El inicio de la transcripción de <i>rup4959</i> disminuye en una cepa mutante en ANR.	131
Figura 8. Identificación del punto de inicio de la transcripción del gen <i>rup4959</i> .	132
Figura 9. Organización genética del operón <i>rup4959-4957</i> .	133
Figura 10. Formación de biopelículas en superficies abióticas por el mutante <i>Rup4959</i> ΩKm.	134
Figura 11. Crecimiento de la cepa silvestre de <i>P. putida</i> KT2440 y de mutantes en genes del operon <i>rup4959-4957</i> en dipéptidos y tripéptidos como fuente de nitrógeno.	134
Figura 12. <i>P. putida</i> KT2440 (pMAMV1) presenta fenotipos asociados con un incremento en los niveles intracelulares de di-GMPc.	135
Figura 13. Disminución de la motilidad en <i>P. putida</i> KT2440 con el gen <i>rup4959</i> en multicopia.	136
Figura 14. Detección y cuantificación de di-GMPc en cepas de <i>P. putida</i> KT2440 mediante análisis HPLC-MS.	137
Figura 15. Dos fenotipos asociados con la sobreexpresión de <i>Rup4959</i> requieren de una molécula señal presente en fase estacionaria de crecimiento.	138

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Pág.**Capítulo 1**

- Figura 1S.** Cinética de colonización de *P. putida* KT2440 en la rizosfera de plantas de maíz. 165
- Figura 2S.** Eficiencia colonizadora de la rizosfera por diferentes mutantes de *P. putida* KT2440 en competición con la cepa silvestre KT2440RTn7-Sm. 165
- Figura 3S.** Adhesión de *P. putida* KT2440 y diferentes mutantes a semillas de maíz. 168
- Figura 4S.** Organización genética del cluster PP2658-PP2560 y del gen PP2561. 168
- Figura 5S.** Colonización radicular de plantas de maíz por *P. putida* KT2440. 169
- Figura 6S.** Curva de crecimiento de *P. putida* KT2440 en arena de sílice (microcosmos). 169

Capítulo 2

- Figura 7S.** Desencadenamiento de resistencia sistémica inducida (ISR) por un mutante *rup* frente a *P. syringae* pv *tomate* DC3000 en plantas de *A. thaliana* Col-0. 170
- Figura 8S.** Detección de cantidades traza del compuesto con relación masa/carga (m/z) 163 en exudados de plantas de *Arabidopsis*. 170
- Figura 9S.** Espectro de absorción del compuesto con relación carga/masa 163 171

Capítulo 3	Pág.
Figura 10S. Motilidad tipo "swimming" de <i>P. putida</i> KT2440R y de diferentes mutantes.	171
Figura 11S. <i>P. putida</i> KT2440 con movimiento tipo "swarming" activo carece de fase de latencia.	172
Figura 12S. Implicación de los LPS en la motilidad tipo "swarming" de <i>P. putida</i> KT2440.	172
Figura 13S. Perfil de LPS de <i>P. putida</i> KT2440 a diferentes temperaturas.	173
Figura 14S. Fenotipo en la rizosfera de cepas mutantes afectadas en motilidad tipo "swarming" en competición con la cepa silvestre KT2440RTn7-Sm.	174
Figura 15S. Adhesión de <i>P. putida</i> KT2440 y mutantes defectivos en motilidad tipo "swarming" a semillas de maíz.	175
Figura 16S. Implicación de los LPS en la motilidad tipo "swimming" de <i>P. putida</i> KT2440.	175
Figura 17S. Concentraciones crecientes de un quelante de hierro inhiben el movimiento tipo "swarming" en <i>P. putida</i> KT2440.	176
Figura 18S. Efecto del citrato férrico sobre la motilidad tipo "swarming" de <i>P. putida</i> KT2440 y los mutantes <i>ppsD</i> y <i>fpvA</i> .	176
Figura 19S. Concentraciones de agar crecientes inhiben la motilidad tipo "swarming" en <i>P. putida</i> KT2440.	177

Capítulo 4	Pág.
Figura 20S. Concentraciones intracelulares elevadas de di-GMPc afectan negativamente la colonización del ápice radicular de plantas de maíz.	179
Figura 21S. Residuos críticos en los motivos conservados en proteínas con dominios GGDEF.	180
Figura 22S. Caracterización fenotípica de <i>P. putida</i> KT2440 y diferentes cepas mutantes, todas portadoras del plásmido pMAMV1.	180
Figura 23S. La transcripción del gen <i>rup4959</i> disminuye con la aireación.	181
Figura 24S. Inducción por benzoato de la transcripción del gen <i>rup4959</i> .	181
Figura 25S. Fenotipo en la rizosfera de diferentes mutantes del operón <i>rup4959-4957</i> en competición con la cepa silvestre KT2440RTn γ -Sm.	182
Figura 26S. Eficiencia colonizadora del ápice radicular por cepas mutantes en Rup4959.	182
Figura 27S. Fenotipo en la rizosfera del mutante Rup4959 Ω Tc en competición con la cepa silvestre KT2440RTn γ -Sm.	183
Figura 28S. Residuos conservados en diferentes proteínas con dominios EAL.	183
Figura 29S. Efecto de los niveles de di-GMPc sobre la transcripción del gen <i>rup4959</i> .	184
Figura 30S. Floculación de <i>P. putida</i> KT2440 (pMAMV1) en diferentes medios de cultivo.	184
Figura 31S. Formación de biopelículas por <i>P. putida</i> KT2440 (pMAMV1) en la interfase líquido-aire en distintos medios de cultivo.	185
Figura 32S. Un mutante Rup4959 Ω Km está ligeramente retrasado en la formación de biopelículas en superficies abióticas.	185
Figura 33S. Los loci PP4958 y PP4957 forman parte de la misma unidad transcripcional que el gen <i>rup4959</i> .	186
Figura 34S. La inducción transcripcional del gen <i>rup4959</i> en presencia de exudados radiculares de <i>Zea mays</i> requiere del	186

factor σ^{38} .**ÍNDICE DE TABLAS**

INTRODUCCIÓN	Pág.
Tabla 1. Compuestos orgánicos detectados en los exudados radiculares.	5
Tabla 2. Tipos de motilidad bacteriana.	21
RESULTADOS	Pág.
<u>Capítulo 1</u>	
Tabla 1. Genes inducidos transcripcionalmente en la rizosfera (genes <i>rup</i>).	54
Tabla 2. Número de genes expresados diferencialmente en la rizosfera (inducidos y reprimidos).	57
Tabla 3. Expresión diferencial de genes <i>rup</i> mediante RT-PCR cuantitativa.	59
<u>Capítulo 2</u>	
Tabla 1. Cepas bacterianas y líneas de <i>Arabidopsis thaliana</i> utilizadas en este capítulo.	68
<u>Capítulo 3</u>	
Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en este capítulo.	80
<u>Capítulo 4</u>	
Tabla 1. Cepas bacterianas usadas en este capítulo.	123
Tabla 2. Plásmidos usados en este capítulo.	124
Tabla 3. Genes con expresión diferencial en la rizosfera en el mutante Rup4959 Ω Tc.	126
Tabla 4. Caracterización fenotípica de <i>P. putida</i> KT2440 y cepas mutantes con niveles elevados de di-GMPc.	127

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Pág.

CAPÍTULO 1

Tabla 1S. Genes inducidos transcripcionalmente en la rizosfera de *Zea mays*. 166

CAPÍTULO 4

Tabla 2S. Dipéptidos y tripéptidos utilizados como fuente de carbono y nitrógeno. 187

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. La Rizosfera y los exudados radiculares

El término rizosfera, derivado de las palabras griegas *rhiza* (raíz) y *sphere* (zona de influencia), se definió por primera vez en 1904 por el fisiólogo vegetal Lorenz Hilter (Hilter, 1904) como la zona inmediatamente adyacente a las raíces que soporta altos niveles de actividad microbiana. Actualmente, el término se ha redefinido como el volumen de suelo que se encuentra bajo la influencia física y biológica de la raíz, y que incluye los tejidos radiculares colonizados por los microorganismos. La extensión física de la rizosfera es difícil de definir pero, en general, se considera que abarca unos pocos milímetros desde la superficie de la raíz (Hawkes *et al.*, 2007; Darrah y Roose, 2007) y se puede dividir en endorrizosfera (endodermis y zona cortical de la raíz), rizoplano (superficie radicular, incluyendo las partículas de suelo que se encuentran fuertemente adheridas a la misma) y ectorrizosfera (suelo inmediatamente adyacente a la raíz), (Morgan *et al.*, 2005) (Fig. 1).

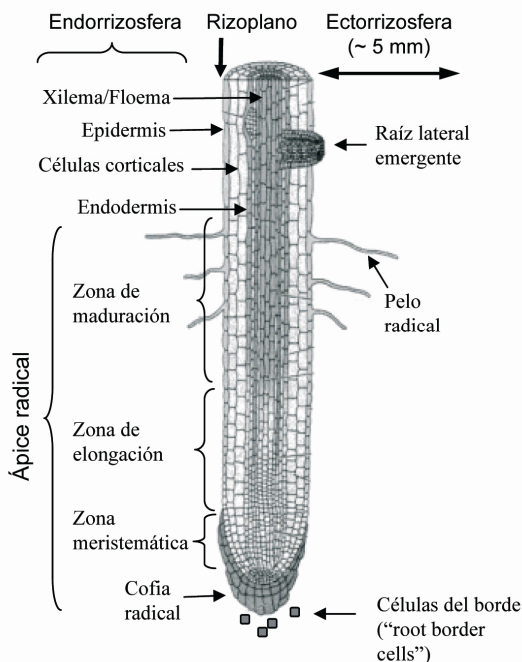


Figura 1. Esquema simplificado de una raíz principal. Se muestran las regiones apicales (zona de maduración, zona de elongación, zona meristemática y cofia radical), además de las subdivisiones de la rizosfera, que abarcan desde los tejidos radiculares hasta unos pocos milímetros por fuera de la superficie radicular. Adaptado de Taiz y Zeiger (2007).

La rizosfera está sometida a enormes fluctuaciones, algunas de ellas diarias, en el contenido de agua, oxígeno y nutrientes: (i) el contenido de agua del suelo muestra incrementos progresivos durante la noche y disminuciones bruscas durante el día debido a las fuertes alteraciones en los niveles de transpiración de la planta (Ishikawa y Bledsoe, 2000); (ii) la tasa de consumo de oxígeno es muy elevada como resultado de la respiración

radicular y microbiana (Højberg y Sørensen, 1993), estimadas en el 40 y 60% respectivamente, del total de la respiración en la rizosfera (Cheng *et al.*, 1993). A su vez, la difusión del oxígeno en el suelo es directamente proporcional a la porosidad del mismo e inversamente proporcional a su contenido en agua, pudiéndose generar condiciones de baja concentración e incluso anaerobiosis (Højberg *et al.*, 1999; Hawkes *et al.*, 2007); y (iii) el pH de la rizosfera es muy variable y puede presentar cambios de hasta dos unidades con respecto al suelo no rizosférico (Schaller, 1987; Youssef y Chino, 1991). Estas variaciones de pH se deben principalmente a la secreción de ácidos orgánicos, extrusión de H^+ y/o OH^- , respiración y procesos de oxido-reducción llevados a cabo por las raíces y microorganismos asociados (Hinsinger *et al.*, 2003).

La rizosfera es una región con un alto contenido en nutrientes. El 30-60% del carbono fijado en la fotosíntesis puede ser transportado a la raíz, y entre el 40-90% de éste se pierde en forma de exudados radiculares (ERs) o debido a la respiración radicular (Lynch y Whipps, 1990; Uren, 2007). Los ERs ejercen una influencia determinante sobre la rizosfera y, como recoge la tabla 1, son ricos en nutrientes tales como azúcares (mono-, di- y oligosacáridos); aminoácidos (proteicos y no proteicos); ácidos orgánicos y vitaminas. Estos compuestos son liberados principalmente por difusión pasiva. Los ERs también contienen productos de excreción tales como etileno, CO_2 , iones bicarbonato y compuestos que se secretan tales como diversas enzimas, mucílagos, sideróforos y metabolitos secundarios, entre los que se encuentran aleloquímicos y quimioatrayentes microbianos (Uren, 2007; y referencias citadas en éste).

1.1. Mecanismos de exudación radicular

En los últimos años se ha producido un gran avance en la definición de la composición de los ERs. Dada su enorme complejidad, los mecanismos responsables de su secreción son muy variados y, en algunos casos, todavía no muy bien conocidos (Fig. 2).

La mayoría de los compuestos orgánicos de bajo peso molecular (azúcares, aminoácidos, ácidos carboxílicos o fenoles) se liberan mediante **difusión pasiva** desde el citoplasma de las células radiculares (compuestos orgánicos en concentraciones del orden de milimolar) al suelo rizosférico

Tabla 1. Compuestos orgánicos detectados en los exudados radiculares**Azúcares y polisacáridos**

Arabinosa, desoxirribosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, manitol, manosa, mucílagos de diferentes composiciones, oligosacáridos, pentosas, rafinosa, ramnosa, ribosa, sacarosa, xilosa.

Aminoácidos y amidas

Los 20 aminoácidos proteínogénicos, α -alanina, β -alanina, α -amino adípico, γ -amino butírico, cistationina, citrulina, fitosideróforos (ácido deoximugineico, ácido mugineico, ácido hidroximugineico, ácido avénico, ácido 3-epihidroximugineico, ácido disticónico), L-hidroxiprolina, homoserina, ornitina.

Ácidos orgánicos

Acético, acónico, aldónico, ascórbico, aspártico, benzoico, butírico, caféico, cítrico, corísmico, p-cumárico, eritónico, ferúlico, fórmico, fumárico, gálico, gentísico, glutárico, glicólico, glioxílico, glucónico, p-hidroxibenzoíco, isocítrico, láctico, maleíco, málico, malónico, oxálico, oxalacético, oxoglutárico, pirúvico, piscídico, propiónico, protocateíco, salicílico, shikímico, sinápico, siríngico, succínico, tartárico, tetrónico, valérico, vinílico.

Ácidos grasos

Esteárico, linoleico, linolénico, oleíco, palmítico.

Esteroles

Estigmasterol, camposterol, colesterol, sitosterol.

Factores de crecimiento

Ácido *p*-aminobenzoico, biotina, colina, ácido *n*-metil nicotínico, niacina pantoténico, vitaminas B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina), B₆ (piridoxina).

Enzimas

Amilasas, celobiasas, dehalogenasas, deshidrogenasas, desoxiribunucleasas, fenolasas, fitasas, fosfatasas, galactosidasas, invertasas, lacasas, lipasas, nitrilasas, nitrorreductasas, peroxidadas, poligaracturonasas, proteasas, ribonucleasas.

Nucleótidos y nucleósidos

Adenina, guanina, uridina, citidina

Metabolitos secundarios

Acidos hidroxicinámicos, ácido salicílico, antocianinas, auxinas, p-benzoquinona, benzoxazinonas compuestos del tipo inositol y mioinositol, dihidroquinona, escopoletina, flavonas, flavononas, formaldehído, glicinabetaína, 8-hidroxiquinolona, isoflavonoides, luteolina, quercetina, quercitrina, sorgoleona.

Componentes inorgánicos y volátiles

NO₃, HPO₃, HCO₃⁻, K⁺, H⁺, CO₂, H₂O, H₂, etileno.

Obtenido de Vančura y Hovadik, 1965; Rovira, 1969; Dakora y Phillips, 2002; Czarnota *et al.*, 2003; Kamath *et al.*, 2004; Bais *et al.*, 2006; Newmann y Römheld, 2007; Uren, 2007; Badri *et al.*, 2009.

(compuestos orgánicos en concentraciones del orden de micromolar). Sin embargo, los niveles de difusión también dependen del estado fisiológico de las células radiculares y de la polaridad de los compuestos exudados, que hace que sus permeabilidades a través del plasmalema varíen (Bertin *et al.*, 2003; Neumann y Römheld, 2007). A pH citosólico, entre 7,1 y 7,4 (Newmann y Römheld, 2007), los compuestos orgánicos más polares (ej. amino ácidos y ácidos orgánicos) se encuentren en forma aniónica y tienen una permeabilidad baja a través del plasmalema. Sin embargo, el gradiente electroquímico que generan las ATPasas de membrana (Mühling *et al.*, 1993) y el potencial de difusión de K^+ desde el citoplasma (Samuels *et al.*, 1992) son los causantes indirectos de la difusión de estos aniones (Neumann y Römheld, 2007; y referencias citadas en éste). Sin embargo, los niveles elevados de exudación de ácidos carboxílicos en respuesta a determinadas situaciones de estrés (Zhang *et al.*, 2001; Kollmeier *et al.*, 2001) no puede explicarse debido a un proceso de difusión pasiva. En estas condiciones se ha identificado que su liberación se produce mediante secreción activa a través de **canales iónicos** localizados en el plasmalema de las células epidérmicas (Shen *et al.*, 2005; y referencias citadas en éste). Además, los canales aniónicos también se han implicado en la liberación de fitosideróforos (Sakaguchi *et al.*, 1999). Los transportadores de la superfamilia **ABC** (del inglés, "ATP Binding Cassette") están involucrados en la secreción de metabolitos secundarios (Martinoia *et al.*, 2002; Badri *et al.*, 2008). Su implicación en la exudación se ha puesto de manifiesto mediante el uso de mutantes (Badri *et al.*, 2008) o utilizando inhibidores de la síntesis de ATP, cuya hidrólisis está acoplada directamente a su transporte (Loyola-Vargas *et al.*, 2007). Existen otros transportadores de membrana, como son los de la familia **MATE** (del inglés, "Multidrug And Toxic compound Extrusion") (Brown *et al.*, 1999) o los de la familia **ALMT** (del inglés, "Aluminium-activated Malate Transporter") (Sasaki *et al.*, 2004), que aunque están menos caracterizados, se han relacionado con la exudación activa de compuestos como citrato (Magalhaes *et al.*, 2007) y malato (Sasaki *et al.*, 2004), respectivamente. La exudación mediante secreción también se produce en unas células diferenciadas derivadas de las células meristemáticas denominadas células del borde (del inglés, "root border cells"). Estas células se separan del ápice y permanecen embebidas en una

matriz polisacáridica en su periferia (Driouiech *et al.*, 2007; y referencias citadas en éste). Además de controlar el crecimiento y la expresión génica en bacterias simbióticas (Hawes *et al.*, 2002; y referencias citadas en éste), las células del borde secretan mediante **exocitosis** compuestos de alto peso molecular tales como mucílagos, antibióticos o enzimas (Neumann y Römheld, 2007; y referencias citadas en éste).

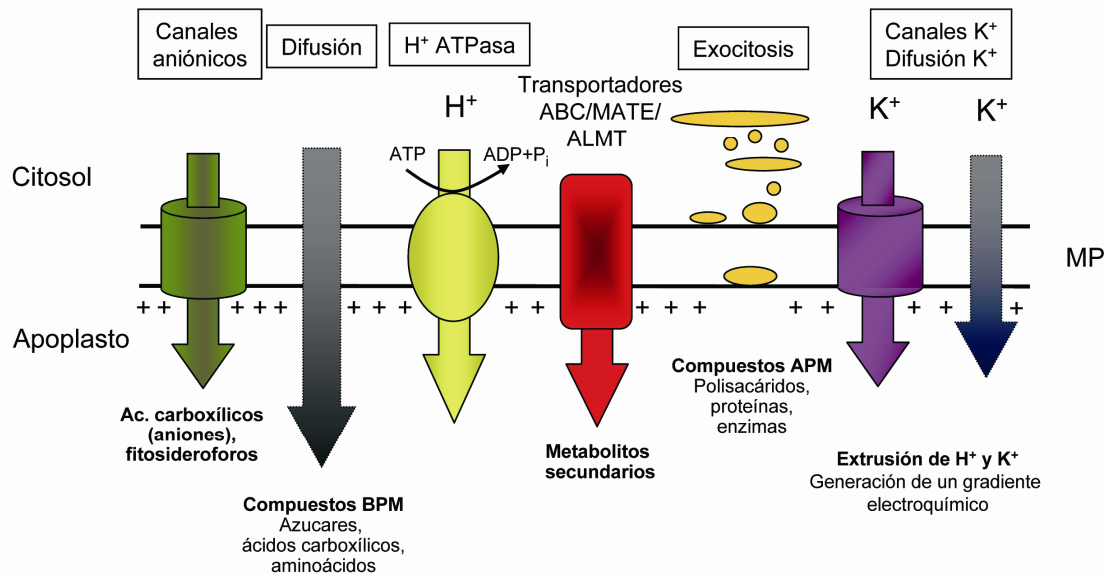


Figura 2. Mecanismos implicados en la exudación radicular. Los componentes de los exudados radicales se liberan mediante mecanismos de difusión pasiva y otros que requieren aporte energético tales como canales iónicos, transportadores de membrana o exocitosis mediada por las células del borde. MP, membrana plasmática; APM, alto peso molecular; BPM, bajo peso molecular. Adaptado de Neumann y Römheld (2007)

1.2. Exudación radicular y efecto rizosfera

La exudación no está homogéneamente distribuída a lo largo de todo el eje radicular sino que es máxima en la espermosfera (región que rodea a la semilla) y en las zonas más jóvenes de la raíz tales como el ápice y las zonas de emergencia de raíces primarias y secundarias (Dandurand *et al.*, 1997; Prikryl y Vancura, 1980; Gransee y Wittenmayer, 2000; Kollmeier, 2001; Walker *et al.*, 2003; Neumann y Römheld, 2007; Uren, 2007). Además, los pelos radicales, que pueden llegar a representar el 77% de la superficie total de la raíz (Parker *et al.*, 2000), presentan también una exudación considerable. De este modo, se generan una serie de gradientes radiales y longitudinales de solutos que se extienden desde la superficie de

la raíz hasta el suelo adyacente (Vetterlein y Jahn, 2004; Darrah y Roose, 2007).

La utilización de nutrientes de los ERs origina la proliferación de un gran número de bacterias metabólicamente activas (Smalla, 2001; Houlden, 2008; Badalucco y Nannipieri, 2007) que pueden alcanzar densidades superiores a 10^{10} bacterias por gramo de suelo (Foster, 1988; Cavaglieri *et al.*, 2009); esto es de 2 a 3 órdenes de magnitud mayor que en suelo no rizosférico (Vančura, 1980; Molina *et al.*, 2000). Dado que sólo el 1-10% de las bacterias rizosféricas son cultivables, a las técnicas clásicas de aislamiento que requieren que las bacterias sean cultivables, se han unido otras técnicas moleculares independientes de cultivo. Así, el análisis del ADN ribosómico, o técnicas como DGGE (del inglés, "Denaturant Gradient Gel Electrophoresis") o TGGE (del inglés, "Temperature Gradient Gel Electrophoresis") (Johnsen *et al.*, 2001; y referencias citadas en éste; De Ridder-Duine *et al.*, 2005; Jussila *et al.*, 2006) permiten estudiar la composición de la microbiota en la rizosfera.

En la actualidad existen discrepancias en cuanto al grado de responsabilidad que se otorga al suelo o a la planta en la conformación de la estructura de la comunidad microbiana rizosférica. Muchos estudios indican que las plantas ejercen la principal fuerza selectiva, modificando la estructura y biodiversidad en función de: (i) la especie y el genotipo (Grayston y Campbell, 1996; Smalla *et al.*, 2001; Kowalchuk *et al.*, 2002; Andreote *et al.*, 2009; Micallef *et al.*, 2009), lo que sugiere un efecto de la fisiología de la planta; (ii) el estado nutricional (Yang y Crowley, 2000) y de desarrollo (Cavaglieri, 2007; Houlden, 2008), además de las características de la región radicular (Yang y Crowley, 2000; van Diepeningen *et al.*, 2005), que es responsable de las diferencias cualitativas y cuantitativas en la exudación; y (iii) la infección por bacterias patógenas (Yang *et al.*, 2001; Fillion *et al.*, 2004). En contraposición a estos datos, otros análisis resaltan la influencia de la población bacteriana presente en el suelo en cuanto a la conformación de la estructura de la comunidad microbiana asociada a la raíz (Buyer *et al.*, 2002; De Ridder-Duine, 2005; Fierer y Jackson, 2006). Integrando toda la información, algunos autores subrayan las interacciones complejas que existen entre la planta y las propiedades físicas del suelo, así como con la comunidad microbiana asociada a él (Marschner *et al.*, 2001;

Garbeva *et al.*, 2008; Berg y Smalla, 2009). Estas variables no deben de tomarse como independientes en el estudio de forma que, la estructura de la población sería el resultado de la interacción de la comunidad microbiana indígena del suelo con la planta (de Ridder-Duine, 2005; Hawkes *et al.*, 2007). Así, según los análisis del ADN_r 16S, la presión selectiva impuesta por la planta es responsable de una disminución en la diversidad, aunque aumente la densidad bacteriana (Marilley *et al.*, 1999).

La presencia de microorganismos asociados a la raíz puede afectar a la composición de los ERs debido a la degradación activa de alguno de sus componentes (Shepherd y Davies, 1994; Jones *et al.*, 2003). Esta biodegradación pudo disminuirse aplicando compuestos antibióticos o bacteriostáticos durante el proceso de obtención de los mismos (Neumann y Römheld, 2007). Sin embargo, la colonización de la raíz por los microorganismos (Přikryl y Vančura, 1980; Lee y Gaskins, 1982; Heulin *et al.*, 1987; Meharg y Killham, 1991; De la Pena *et al.*, 2008) o incluso la presencia de metabolitos microbianos (Meharg y Killham, 1995; Phillips *et al.*, 2004) puede aumentar los niveles de exudación. Dicho aumento puede estar directamente relacionado con la promoción del crecimiento vegetal llevado a cabo por algunas rizobacterias (Somers *et al.*, 2004; van Loon, 2007; y referencias citadas en éstos). Los mecanismos por los cuales estas rizobacterias promueven el desarrollo de la planta se citarán más adelante en esta introducción.

2. Beneficios de la interacción planta-bacteria en la rizosfera

La promoción del crecimiento vegetal es uno de los beneficios de la interacción planta-bacteria en la rizosfera. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR; del inglés, "Plant Growth Promoting Rhizobacteria"), entre las que se encuentran bacterias de los géneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* o *Serratia* (Vessey, 2003; Somers *et al.*, 2004; y referencias citadas en éstos), colonizan competitivamente la rizosfera y estimulan el desarrollo vegetal y/o reducen la incidencia de los agentes fitopatógenos (control biológico de enfermedades o biocontrol) (Mercado-Blanco y Bakker, 2007; y referencias citadas en éste). Un mecanismo por el que se ejerce la

promoción del crecimiento vegetal es por una mejora en el estado nutricional de la planta mediante el aporte de nutrientes limitantes para la misma (biofertilizantes). Así, algunas bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* (Holguin y Bashan, 1996) y *Pseudomonas* (Desnoues *et al.*, 2003), convierten el nitrógeno atmosférico en amonio, que posteriormente será utilizado por la planta como fuente de nitrógeno (Dixon y Kahn, 2004). Además, otras bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* o *Xanthomonas* pueden actuar como solubilizadores de fosfato inorgánico del suelo, haciéndolo disponible para las plantas (Rodríguez y Fraga, 1999; Somers *et al.*, 2004; Rosas *et al.*, 2006). Otro mecanismo por el que ejercen su función las PGPR es a través de la producción hormonas vegetales (fitoestimulantes) tales como citoquininas, giberelinas o auxinas (Vessey, 2003; Preston, 2004; y referencias citadas en éstos) o volátiles estimuladores del crecimiento (2,3-butanodiol) (Ryu *et al.*, 2003a).

Rizobacterias pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* pueden funcionar también como agentes de biocontrol (Whipps, 2001; Haas y Défago, 2005; y referencias citadas en éstos). Un requerimiento para que ejerzan sus funciones de biocontrol es que presenten una eficiente colonización de la rizosfera (Haas y Défago, 2005). Así, por ejemplo, existe una correlación positiva entre la mayor colonización de raíces de trigo por *Pseudomonas fluorescens* 2-79 y la disminución de la enfermedad causada por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Esta colonización debe de ser superior a 10^5 - 10^6 UFC por gramo de suelo rizosférico (Bull *et al.*, 1991). Además, mutantes de *P. chlororaphis* PCL1391 defectivos en colonización de ápices radiculares de tomate pierden su capacidad de biocontrol frente a al hongo *Fusarium oxysporum* (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000). Un mecanismo de biocontrol es la competición por micronutrientes, en particular el hierro. La síntesis de sideróforos se induce en concentraciones limitantes de hierro y permite a las bacterias la adquisición efectiva de dicho micronutriente (Miethke y Marahiel, 2007). Se ha demostrado que la producción de sideróforos puede inhibir "in vitro" el crecimiento de hongos (Mercado-Blanco *et al.*, 2004; Recep *et al.*, 2009) y de bacterias (Deka-Boruah y Dileep-Kumar *et al.*, 2002; Thomas *et al.*, 2004), (Fig. 3). En la rizosfera, los sideróforos ejercen su papel en biocontrol a través de la disminución de

la disponibilidad de hierro por parte de los fitopatógenos (Mercado-Blanco y Bakker, 2007; y referencias citadas en éste). Este sería el caso de *P. putida* WCS358, que reduce en un 30% la incidencia de la enfermedad en plantas de rábano frente al hongo *F. oxysporum*. Por el contrario, un mutante de WCS358 deficiente en la síntesis de sideróforos no protege frente al ataque del hongo (Raaijmakers *et al.*, 1995).

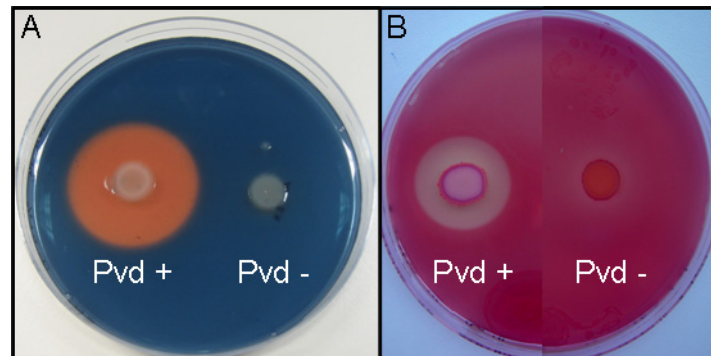


Figura 3. Antibiosis sobre *Bacillus subtilis* ejercida por el sideróforo pioverdina (Pvd) de *P. putida* KT2440. A, Detección de la producción de sideróforos empleando cromo azul sulfonato (CAS), (Schwyn y Neilands, 1987) en la bacteria *P. putida* KT2440 (Pvd+) y en un mutante *ppsD* defectivo en la producción de pioverdina (Pvd-). B, La producción de pioverdina por KT2440 inhibe el crecimiento de *B. subtilis*. Esta inhibición desaparece en el mutante *ppsD*.

Además de la producción de sideróforos, la síntesis de otros metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas tales como ácido cianhídrico, diacetilfloroglucinol, fenazinas, lipopéptidos cíclicos, pioluteorina o pirrolnitrina, es importante en biocontrol (Raaijmakers *et al.*, 2002; Ongena y Jacques, 2007; y referencias citadas en éste). Así, estudios con mutantes de *P. fluorescens* defectivos su producción presentan una menor capacidad fitoprotectora (Thomashow y Weller, 1988; Voisard *et al.*, 1989; Maurhofer *et al.*, 1995). La síntesis de estos metabolitos está regulada positivamente a nivel post-transcripcional por el sistema de dos componentes GacS/GacA (Heeb y Haas, 2001; y referencias citadas en éste). No se conoce la señal ambiental que actúa sobre GacS que conduce a la síntesis de los ARNs reguladores *rsmX*, *rsmY* y *rsmZ*. Estos ARNs pequeños se unen específicamente a las proteínas RsmA y RsmE, eliminando la represión que éstas ejercen sobre los genes responsables de la síntesis de distintos metabolitos secundarios con actividad biológica (Haas y Défago, 2005; y referencias citadas en éste). Así, mutantes *gacS* o *gacA* presentan una

menor capacidad de biocontrol que la cepa silvestre en diferentes especies de *Pseudomonas* (Duffy y Défago, 2000; Ligon *et al.*, 2000; Heeb y Haas, 2001).

Además de los mecanismos directos de biocontrol citados anteriormente, algunas PGPR pueden proteger a la planta frente al ataque de patógenos mediante un mecanismo indirecto como es el desencadenamiento de resistencia sistémica inducida (ISR; del inglés, "Induced Systemic Resistance"). El modo de acción de ISR se descubrió simultáneamente en estudios realizados por dos grupos de investigación (Van Peer *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1991). En estos estudios existía separación espacial entre la rizobacteria y el patógeno, eliminando la posibilidad de que la protección fuese el resultado de la interacción directa entre ambos e indicando que el mecanismo de protección estaba mediado por la planta. La reducción de la enfermedad está asociada con una disminución en la colonización y en el crecimiento del patógeno en los tejidos de la planta (van Loon y Bakker, 2005). En los estudios de ISR, la planta modelo es *Arabidopsis thaliana* y se conoce que el desencadenamiento de esta forma de resistencia es dependiente de vías de señalización reguladas por el ácido jasmónico (JA) y el etileno (ET) (Fig. 4) (Pieterse *et al.*, 1998). Fenotípicamente, la respuesta ISR es similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR; del inglés, "Systemic Acquired Resistance"), aunque esta última está mediada por patógenos que producen necrosis y es dependiente de la acumulación endógena de ácido salicílico (SA) (Vlot *et al.*, 2008; y referencias citadas en éste). Ambas rutas de resistencia convergen a nivel de la proteína reguladora NPR1 (Fig. 4) (Pieterse *et al.*, 1998), aunque en la expresión de ISR en *A. thaliana* no se expresan las proteínas PR (del inglés, "Pathogenesis Related") (Pieterse *et al.*, 1996; 2000). En cuanto a la inducción de ISR, no siempre se conoce el mecanismo concreto por el que se activan las defensas de la planta, pero se han identificado elicitores bacterianos sobre los que recae esta función (Ebel y Mithöfer, 1998). Algunos de ellos son lipopolisacáridos (Van Wees *et al.*, 1997; Meziane *et al.*, 2005), flagelos (Zipfel *et al.*, 2004; Meziane *et al.*, 2005), sideroforos (Leeman *et al.*, 1996; Meziane *et al.*, 2005), ácido salicílico (Maurhofer *et al.*, 1998; Audenaert *et al.*, 2002), antibióticos (Iavicoli *et al.*, 2003; Audenaert *et al.*, 2002), homoserín-lactonas (Schuhegger *et al.*, 2006) o

compuestos volátiles (Ryu *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2006). El estado defensivo activado que se establece en ISR se denomina “priming” y permite una respuesta más rápida y eficaz frente al patógeno en plantas elicidadas por rizobacterias (Conrath *et al.*, 2006; van Hulten *et al.*, 2006). Así, en un análisis genómico realizado con hojas de plantas de *Arabidopsis* que están expresando ISR, Verhagen y colaboradores (2004) observaron que en respuesta al ataque del fitopatógeno, se produce una expresión génica diferencial con respecto a las plantas control. Estas diferencias son inexistentes en ausencia de infección.

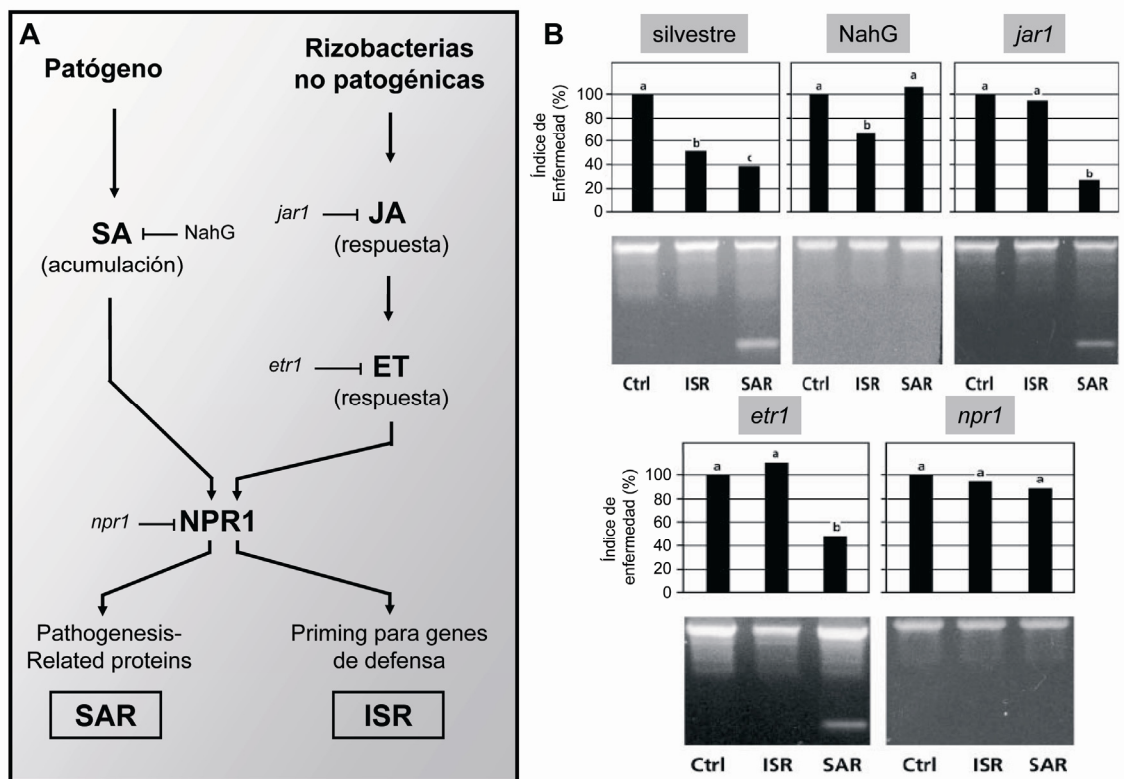


Figura 4. Mecanismo de transducción de señal en ISR y SAR. A, Modelo vigente para el desencadenamiento de ambas resistencias sistémicas. Las plantas mutantes *jar1* (del inglés, “affected JA response 1”) tienen afectada la respuesta al JA. Las plantas mutantes *etr1* (del inglés, “ET receptor mutant 1”) son insensibles al etileno. Las plantas transgénicas NahG no acumulan SA. Las plantas mutantes *npr1* tienen mutada la proteína reguladora NPR1 (del inglés, “Non-expressor of PR genes 1”). B, Cuantificación de ISR y SAR en plantas de *A. thaliana* frente al patógeno *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. Mutantes *etr1*, *jar1* y *npr1* son defectivos en el desencadenamiento de ISR. Las plantas transgénicas NahG y mutantes *npr1* no expresan SAR, que está asociado con la expresión de PR-1. El índice de enfermedad está referido al porcentaje de hojas enfermas en plantas expresando ISR y SAR con respecto a las plantas control que no expresan ninguna de las dos resistencias. Adaptado de Pieterse y colaboradores (1998).

3. Características bacterianas diferenciales de la vida en superficie

En la naturaleza es habitual que las bacterias aparezcan asociadas formando comunidades altamente organizadas denominadas biopelículas (BPs) o "biofilms" (Hall-Stoodley *et al.*, 2004) en las que aparecen embebidas en una matriz extracelular compleja compuesta por una mezcla de agua y macromoléculas como ADN, polisacáridos y proteínas (Whitchurch *et al.*, 2002; Branda *et al.*, 2005).

Las células que forman parte de una BP son diferentes fisiológicamente a las células planctónicas (Sauer *et al.*, 2002; Webb *et al.*, 2003; Beloin y Ghigo, 2005) de manera que presentan una mayor resistencia al estrés causado por la luz UV, desecación o gradientes de pH. Además, la resistencia frente a agentes antimicrobianos puede llegar a ser mil veces mayor (Monds y O'Toole, 2009; y referencias citadas en éste). La barrera física creada por la matriz exopolisacarídica es, en parte, la responsable de esta menor sensibilidad frente a diferentes estreses (Kierek-Pearseon y Karatan, 2005). En esta resistencia también juega un papel importante la heterogeneidad química dentro del "biofilm" y la variabilidad genética de las células bacterianas que lo componen (Stewart y Franklin, 2008). El origen de la heterogeneidad química, está en la difusión de solutos desde el exterior del "biofilm" y en la acumulación de productos derivados del metabolismo bacteriano (Nadell *et al.*, 2009; y referencias citadas en éste). Esta heterogeneidad genera diferencias en el metabolismo y en la fisiología bacteriana, así como en la expresión génica (Stewart y Franklin, 2008; y referencias citadas en éste). La variabilidad genética en una BP se estima en un 10% como consecuencia de aparición de mutaciones, reorganizaciones o procesos conjugativos (Stewart y Franklin, 2008; y referencias citadas en éste). En *P. aeruginosa*, RecA es responsable de generar variantes genéticas que presentan diferencias en los requerimientos nutricionales, en la morfología de colonias y en la capacidad diferencial de formar BPs (Boles *et al.*, 2004). Por otro lado, a consecuencia de la alta densidad celular y el contacto estrecho entre las bacterias, está facilitada la transferencia horizontal de genes mediante conjugación (Hausner y Wuertz, 1999; Ghigo, 2001; Espinosa-Urgel, 2004; Sørensen *et al.*, 2005).

La formación de un "biofilm" no es un proceso aleatorio, sino que es el resultado de una secuencia de pasos complejos regulados genéticamente (Kierck-Pearson y Karatan, 2005). La mayoría de los estudios genéticos sobre la formación de BPs se refieren a superficies abióticas. Estos estudios proponen la existencia de cinco etapas en la formación de "biofilms" (Fig. 5) que comienzan con la unión reversible de una célula planctónica a la superficie (1); en el caso de estabilizarse la unión, ésta resultará firme e irreversible (2), con la consiguiente aparición de agregados celulares denominados microcolonias (3); dichas microcolonias pueden crecer en tamaño desarrollando macrocolonias (4). En la etapa que cierra el ciclo vital de la formación de la BP, se puede producir una dispersión de células desde las macrocolonias, volviendo éstas a un estilo de vida planctónico (5). Esta etapa es importante, sobre todo desde el punto de vista ecológico, ya que permite la colonización de nuevos hábitats (revisado en Sauer *et al.*, 2002; Kierck-Pearson y Karatan, 2005; Nadell *et al.*, 2009).

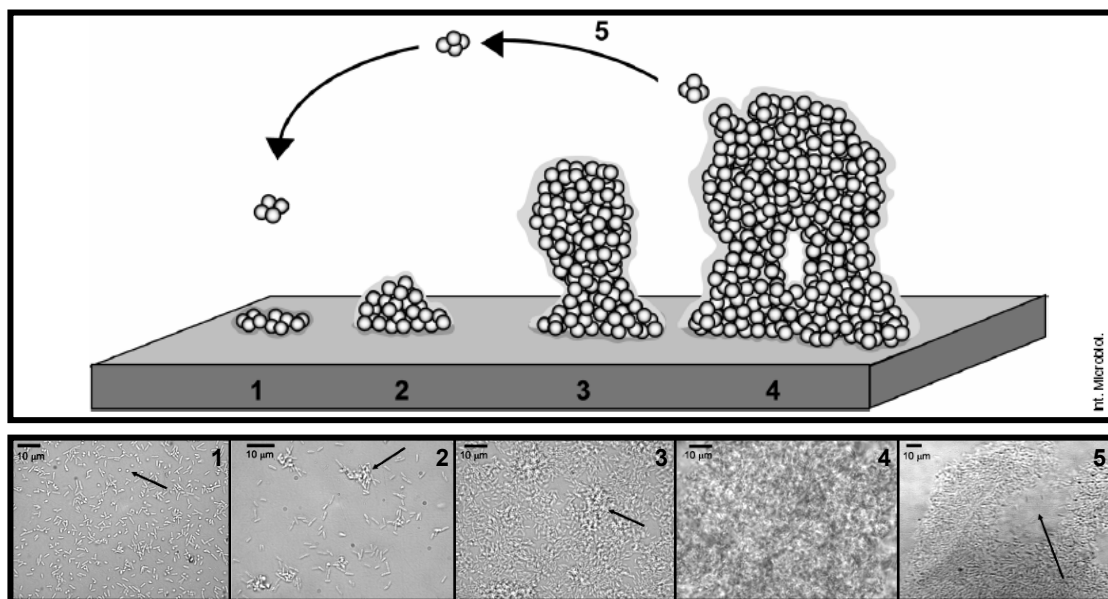


Figura 5. Esquema del proceso de formación de una BP en superficies abióticas. Esquema obtenido de Lasa (2006). Se incluyen imágenes de microscopía de transmisión de *P. aeruginosa* PAO1 extraídas de Sauer y colaboradores (2002).

Existen ciertos paralelismos en la formación de BPs en superficies abióticas y bióticas. Además de en los determinantes genéticos requeridos para la formación de "biofilms" en ambas superficies. En lo que respecta a las asociaciones planta-bacteria en la rizosfera, la interacción física entre ambos puede resultar en la formación de microcolonias y eventualmente, la

formación de BPs maduras en la superficie de los tejidos vegetales (Ramey *et al.*, 2004a; Rudrappa *et al.*, 2008; y referencias citadas en éstos). El mecanismo de formación de "biofilms" en las raíces es muy complejo debido al enorme dinamismo de los sistemas radiculares y a las fluctuaciones en los factores abióticos que, como hemos visto, tienen lugar en la rizosfera (Else *et al.*, 2003; Stanley y Lazazzera, 2004). El desarrollo de técnicas de microscopía y el empleo de proteínas autofluorescentes en el marcaje bacteriano tales como GFP (del inglés, "Green Fluorescent Protein") y otras variantes, han permitido avanzar en el estudio de la colonización y formación de BPs "in situ" en superficies radiculares (Bloemberg, 2007; y referencias citadas en éste). Así, Timmusk y colaboradores (2005) realizaron un seguimiento de la formación de BPs en raíces de *Arabidopsis* colonizadas por *Paenibacillus polymyxa* marcados con GFP. En este estudio, el tiempo requerido para la formación del "biofilm" dependió del sistema experimental utilizado, pero siempre se observaron microcolonias en las etapas iniciales de la colonización y la formación de un "biofilm" en las etapas posteriores (Fig. 6). Que las microcolonias crezcan en tamaño y formen macrocolonias también se ha observado durante la colonización de plántulas de trigo por *Azospirillum brasilense*. En este caso, se requiere de diez días para la aparición de microcolonias y treinta para el desarrollo de macrocolonias en la zona de los pelos radiculares (Assmus *et al.*, 1995). Durante la colonización de raíces de maíz por *P. putida* KT2440, la formación de microcolonias es rápida y aparecen 2,5 h después de que la inoculación de bacterias tenga lugar a una distancia de 1 mm de la raíz (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002). Esta formación de microcolonias por *P. putida* KT2440 también se ha observado durante la colonización de raíces de cebada (Ramos *et al.*, 2000a). Además, en la colonización radicular de plantas de alfalfa, tomate y *Arabidopsis* por *Agrobacterium tumefaciens*, se observan inicialmente células aisladas o pequeños agregados celulares adheridos a la superficie. Después de 7 h desde su inoculación ya se observan grandes agregados en la superficie epidérmica y en los pelos radiculares, que originan la formación de una densa BP a las 31 h (Matthysse *et al.*, 2005).

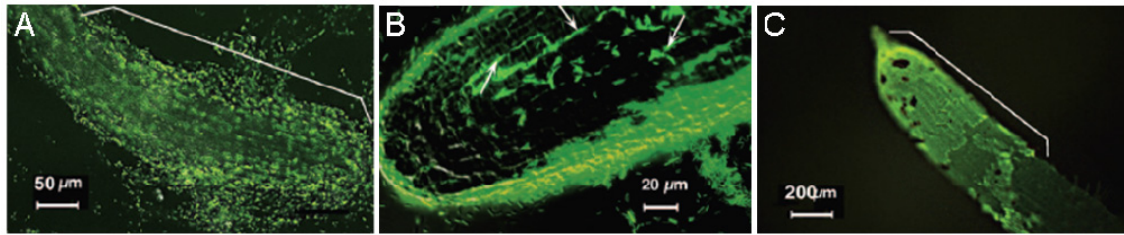


Figura 6. Microfotografías de fluorescencia mostrando la formación de BPs en raíces de *Arabidopsis* colonizadas por *P. polymyxa*. En cultivos "in vitro" (A, B), la formación de BPs se observa a las pocas horas de la inoculación. La formación de microcolonias (A) y de "biofilms" (B) se aprecia a las 2 h y 5 h de la inoculación, respectivamente. En experimentos realizados en arena, la formación de BP es más lenta, apareciendo a partir del tercer día de inoculación. "Biofilm" formado después de 7 días (C). Imágenes obtenidas de Timmusk y colaboradores (2005).

4. Colonización bacteriana de la rizosfera

Bacterias de los géneros *Agrobacterium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* o *Pseudomonas* son colonizadores frecuentes de la rizosfera (Sørensen *et al.*, 2001; Somers *et al.*, 2004; Rudrappa *et al.*, 2008). Las rizobacterias tienen una mayor capacidad colonizadora que las bacterias no rizosféricas (Hozore y Alexander, 1991; Lugtenberg y Dekkers, 1999). Esta colonización de la rizosfera tiene lugar de forma muy heterogénea, mostrando preferencia por unas determinadas áreas, que pueden representar sólo el 6% del total de la superficie radicular (Lugtenberg y Bloemberg, 2004; Gamalero *et al.*, 2005). Watt y colaboradores (2006) utilizaron técnicas de hibridación "in situ" asociada a fluorescencia (FISH) para evaluar la distribución de la colonización de bacterias nativas en las raíces de trigo. El 60% de estas bacterias se encuentran formando microcolonias a una distancia de la superficie radicular entre 2-31 μm y mayoritariamente asociadas a pelos radiculares, células de la cofia o ranuras axiales de la raíz (Watt *et al.*, 2006). La colonización fue muy irregular como resultado de la presión selectiva que ejercen los exudados. Por ello, las bacterias de crecimiento lento colonizaron principalmente la región madura de la raíz, mientras que las bacterias del género *Pseudomonas*, versátiles metabólicamente y de crecimiento rápido, mostraron una colonización más homogénea a lo largo del eje longitudinal radicular (Watt *et al.*, 2006). También se ha descrito heterogeneidad durante la colonización de raíces de guisante (Dandurand *et*

al., 1997), tomate (Chin-A-Woeng *et al.*, 1997) y zanahoria (Bianciotto *et al.*, 2001) por *P. fluorescens*, que coloniza principalmente pelos radiculares, regiones intercelulares o zonas de emergencia de raíces secundarias. *P. fluorescens* se encuentra embebida en una matriz mucoide de origen vegetal (Chin-A-Woeng *et al.*, 1997) y coloniza principalmente la base de la raíz, donde forma microcolonias de gran densidad; por el contrario, en el ápice sólo se observan bacterias aisladas que en número representan 4 órdenes de magnitud menos con respecto a la base de la raíz (Lugtenberg *et al.*, 2001). La mayor densidad en la base radicular es frecuente en las bacterias del género *Pseudomonas* (Lugtenberg y Leveau, 2007). Además, esta distribución también se observa durante la colonización de tomate por *Acidovorax facilis*, *Acinetobacter radioresistens* y *Xanthomonas oryzae* (Chin-A-Woeng *et al.*, 1997) o de *A. thaliana* por *B. subtilis* FB17 (Rudrappa *et al.*, 2008). Sin embargo, la localización varía ampliamente en función de la especie bacteriana. Baste citar a *A. brasilense* que forma densas BPs preferentemente en la zona de elongación de la raíz y en los pelos radiculares (Assmus *et al.*, 1995), *P. polymyxa* que coloniza las zonas de elongación y de diferenciación del ápice radicular de *Arabidopsis* (Timmusk *et al.*, 2005) o *Azoarcus* sp. strain BH72 que coloniza principalmente la zona de emergencia de raíces secundarias en plantas de arroz (Böhm *et al.*, 2007). Un caso curioso es el de *Azospirillum irakense* y *Azospirillum brasilense* que colonizan los pelos y el resto de la raíz de plantas de arroz, respectivamente, lo que hace que ambas especies no compitan en el proceso de colonización (Zhu *et al.*, 2002). Merece la pena destacar que, dependiendo de la especie vegetal, la distribución de la colonización puede ser diferente. Éste es el caso de *Methylobacterium suomiense* CBMB120, que coloniza las zonas de emergencia de raíces secundarias y espacios intercelulares en raíces de tomate. En cambio, en raíces de arroz no se ha encontrado en regiones intercelulares (Poonguzhali *et al.*, 2008).

Rudrappa y colaboradores (2008) han establecido, en base a evidencias experimentales, un modelo hipotético que explica la falta de uniformidad observada en las raíces colonizadas. Este modelo asigna un papel predominante a la disponibilidad de nutrientes. Los lugares de mayor colonización se corresponderían con los de mayor exudación. Según esta hipótesis, los ERs ejercen un efecto quimioatractivo sobre las bacterias,

con la consiguiente formación de microcolonias y posteriormente de BPs maduras. Diferentes estudios han relacionado la disponibilidad de nutrientes con la formación de BPs asociadas a superficies abióticas, de manera que se requieren unos niveles equilibrados de carbono (Klausen *et al.*, 2003b; Shrouf *et al.*, 2006), fósforo (Allan *et al.*, 2002) o nitrógeno (Allan *et al.*, 2002) para el desarrollo de un "biofilm" estructurado. Sin embargo, la formación de "biofilms" en localizaciones concretas de la raíz como las hendiduras intercelulares, no se explica simplemente por los niveles de exudación. En estas regiones la rugosidad de la superficie podría constituir un factor crítico que incrementa la adhesión bacteriana y por consiguiente, la colonización (Dandurand *et al.*, 1997; Percival *et al.*, 1999; Teughels *et al.*, 2006).

4.1. Utilización de nutrientes de los ERs

El estudio de la utilización de nutrientes de los exudados se ha realizado principalmente mediante el empleo de mutantes bacterianos deficientes en su metabolismo. Un ejemplo de ello es *P. fluorescens* WCS365, una eficiente colonizadora de la rizosfera de tomate (Simons *et al.*, 1996). Un mutante *mdh* de WCS365 en la malato deshidrogenasa, que es deficiente en la utilización de ácidos orgánicos como fuente de carbono, está afectado en colonización competitiva de raíces de tomate, mientras que un mutante *zwf* en la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, deficiente en la utilización de azúcares, es igualmente competitivo (Lugtenberg *et al.*, 1999). Los ERs de tomate tienen un contenido en ácidos orgánicos cinco veces mayor al de azúcares (Lugtenberg *et al.*, 2001), lo que indicaría que los ácidos orgánicos son la principal fuente de carbono para esta cepa en la rizosfera de tomate. Un ejemplo de la importancia del catabolismo activo sobre azúcares presentes en los exudados lo constituye *Enterobacter cloacae*. Un mutante *pfkA*, deficiente en la utilización de muchos azúcares, pero que conserva intacta su capacidad de metabolizar fructosa, coloniza mejor la espermosfera de plantas con mayor contenido en este azúcar (Roberts *et al.*, 1999, 2000). Como continuación a estos estudios, Liu y colaboradores (2007) compararon la contribución de la utilización de azúcares y ácidos orgánicos en la colonización de la rizosfera. Mediante estudios de

competición entre un mutante *pfkA* y un mutante *sdhA* en la succinato deshidrogenasa se observó que este último era más competitivo, lo que otorgaría un papel relevante al metabolismo de azúcares durante la colonización de la rizosfera por *E. cloacae*. En cuanto a los aminoácidos, su concentración en los ERs de tomate no es suficiente para soportar el crecimiento bacteriano (Simons *et al.*, 1997). Así, mutantes auxótrofos para leucina, arginina, histidina, isoleucina, valina o triptófano en *P. fluorescens* WCS365 no colonizan sus ápices radiculares (Simons *et al.*, 1997). La disminución en la colonización también se ha observado en mutantes auxótrofos para glutamina y triptófano durante la colonización de la rizosfera de trigo por *A. brasilense* (Arsène *et al.*, 1994). Asimismo, mutantes auxótrofos de *P. putida* KT2440 para fenilalanina, triptófano y tirosina están afectados en la colonización competitiva de la rizosfera de maíz (Molina-Henares *et al.*, 2009). Análogamente, la capacidad de sintetizar vitaminas como la tiamina por *P. fluorescens* WCS365 (Simons *et al.*, 1996) es también importante para la eficiencia competitiva en la rizosfera. Además del metabolismo de nutrientes, cabe mencionar también la necesidad de la regulación del transporte de los nutrientes presentes en los exudados. Así, un mutante de *P. fluorescens* WCS365 con una mayor capacidad de captura de putrescina (Kuiper *et al.*, 2001) está afectado en la colonización competitiva de la rizosfera, mientras que un mutante defectivo en su captura es igualmente competitivo (Kuiper *et al.*, 2001). En general, la capacidad de utilizar y competir por los nutrientes de los exudados es fundamental para la colonización y supervivencia en la rizosfera, de tal modo que bacterias afectadas en estas funciones tienen una colonización reducida.

4.2. Importancia de la motilidad para la colonización de la rizosfera

Durante la colonización de la rizosfera, las bacterias pueden emplear diferentes tipos de motilidad tales como "swimming", "swarming", "twitching", "gliding" o "sliding", que se diferencian en aspectos como el apéndice celular empleado para el desplazamiento o la velocidad de expansión (Tabla 2) (Bardy *et al.*, 2003; Harshey, 2003).

Tabla 2. Tipos de motilidad bacteriana

Tipo de movimiento	Apéndice celular	Diferenciación celular	Velocidad expansión ($\mu\text{m/s}$)
"Swimming"	Flagelo	No	>40
"Swarming"	Flagelo/Pili de tipo IV	Si	2-10
"Twitching"	Pili de tipo IV	No	0.06-0.3
"Gliding"	Desconocido	No	0.025-10
"Sliding/Spreading"	Translocación pasiva	No	0.03-6

Obtenido de Harshey (2003).

Entre los beneficios potenciales de la motilidad durante la colonización se incluye una mayor accesibilidad a nutrientes o la posibilidad de alcanzar regiones concretas de la raíz (Turnbull *et al.*, 2001). La motilidad de distintas rizobacterias ha quedado patente mediante el aislamiento de diez cepas bacterianas eficientes colonizadoras de la rizosfera de plantas de aguacate. Todos los aislados presentaron motilidad tipo "twitching", ocho de ellos tipo "swimming" y cinco tipo "swarming" (Pliego *et al.*, 2007). El estudio de la motilidad bacteriana en la rizosfera se ha realizado principalmente mediante el empleo de mutantes defectivos en "swimming". Así, varios autores han demostrado que mutantes de diferentes especies de *Pseudomonas* que están afectados en "swimming" no son deficientes en colonización de la rizosfera de trigo (Howie *et al.*, 1987), soja (Scher *et al.*, 1988) o guisante (Bowers *et al.*, 1993). En contraposición a estos estudios, se ha destacado la importancia de la motilidad en mutantes defectivos en "swimming" de *P. fluorescens* (de Weger *et al.*, 1987; Simons *et al.*, 1996; Dekkers *et al.*, 1998c), *P. chlororaphis* (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000) y *P. putida* (Simons *et al.*, 1996) ya que todos presentaron deficiencias en la colonización del ápice radicular de plantas de tomate. Además, se ha observado que variantes hipermóviles de *P. brassicacearum* (Aachouak *et al.*, 2004) y de *P. fluorescens* (Martínez-Granero *et al.*, 2006) presentan una mayor eficiencia colonizadora de ápices radiculares que la cepa silvestre. Todo esto es indicativo de la necesidad de la motilidad bacteriana para la colonización de partes distales de la raíz. Por otro lado, en lo que respecta a la caracterización de otros tipos de motilidad durante la colonización de la rizosfera, los estudios son escasos. Conviene destacar un trabajo de Böhm y colaboradores (2007) en el que concluyen que la

motilidad tipo "twitching" es importante para la colonización endofítica de raíces de arroz, mientras que su importancia es menor para la colonización de la superficie radicular.

4.3. Quimiotaxis (QT) y colonización de superficies radiculares

La colonización de la rizosfera por bacterias presentes en el suelo no rizosférico puede tener lugar mediante un proceso pasivo (ej. a través de flujos de corrientes) o debido a un proceso activo de movilidad bacteriana. En este último caso, los ERs participan en las etapas iniciales de la colonización ejerciendo un efecto quimiotáctico (Somers *et al.*, 2004; Danhorn y Fuqua, 2007). Así, mutantes *cheA* de *P. fluorescens* defectivos en QT son menos competitivos en la colonización radicular de tomate a pesar de mantener intacta su motilidad dependiente de flagelo (de Weert *et al.*, 2002). Lo mismo ocurre en mutantes de QT de *Ralstonia solanacearum* (Yao y Allen, 2006). Se ha demostrado que nutrientes de los ERs como ciertos aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos ejercen un efecto quimiotáctico sobre bacterias de géneros tales como *Pseudomonas* (Futamata *et al.*, 1998; de Weert *et al.*, 2002), *Bacillus* (Zheng y Sinclair, 1996; Yaryura *et al.*, 2008) o *Azospirillum* (Zhulin *et al.*, 1988; López de Victoria y Lovell, 1993). Sin embargo, como los procesos de QT son altamente específicos, puede ocurrir que lo que sea quimioatrayente en un caso no lo sea en otro. Así por ejemplo, los ácidos orgánicos son los principales nutrientes para el crecimiento de *P. fluorescens* en la rizosfera de tomate (Lugtenberg *et al.*, 2001), actuando como quimioatrayentes durante la colonización, mientras que no lo hacen los azúcares (de Weert *et al.*, 2002). La especificidad de la quimioatracción también se hizo patente en un análisis transcripcional de *P. aeruginosa* en presencia de ERs de dos variedades de remolacha (Mark *et al.*, 2005). Sólo uno de los ERs tuvo efecto sobre la expresión de genes relacionados con QT.

Una vez que la célula bacteria ha alcanzado la superficie radicular, la adhesión es el primer paso para la colonización radicular y la posible formación de BPs. En esta unión inicial, apéndices celulares tales como fimbrias, pili de tipo IV y flagelos tienen un papel importante, mostrando un cierto paralelismo con lo que sucede en superficies abióticas, en donde son

necesarios para la estabilización de la interacción con la superficie y para reducir el efecto de las fuerzas electrostáticas repulsivas entre el sustrato y la superficie celular bacteriana (Pratt y Kolter, 1998; Kierck-Pearson y Karatan, 2005; y referencias citadas en éste). Así, mutantes de *P. fluorescens* carentes de flagelo (DeFlaun *et al.*, 1994) y mutantes *fliA* y *flgL* de *P. putida* (Yousef-Coronado *et al.*, 2008; Rodríguez-Hervá *et al.*, 2009) están afectados en motilidad "swimming" y en la adhesión a semillas. Los flagelos también tienen un papel directo en la adhesión a raíces en *A. brasilense*. Mutantes que carecen de flagelos son deficientes en la adhesión a raíces de trigo y la purificación de estos flagelos demostró que éstos se adherían "in vitro" a raíces de trigo (Croes *et al.*, 1993). Por otro lado, mutantes *pilA*, que son defectivos en pili de tipo IV de *R. solanacearum*, presentan una notable disminución en la adhesión a raíces de tomate (Kang *et al.*, 2002). Igualmente, se ha visto una correlación positiva entre la síntesis de pili tipo I (fimbrias) en *P. fluorescens* y la adhesión a raíces de maíz (Vesper, 1987).

En la adhesión a superficies radiculares también intervienen proteínas de membrana externa que, a su vez, son importantes para la formación de BPs en superficies abióticas en *Enterococcus faecalis* (Toledo-Arana *et al.*, 2001), *P. fluorescens* WCS365 (Hinsa *et al.*, 2003), *Escherichia coli* (Roux *et al.*, 2005) o *Salmonella enterica* (Latasa *et al.*, 2005). La importancia de estas proteínas se ha observado en *P. putida* KT2440, que requiere de la adhesina LapA para una adhesión eficiente a semillas de maíz y para obtener una adecuada colonización competitiva de la raíz (Yousef-Coronado *et al.*, 2008). Además, la adhesina LapF, única en *P. putida*, parece tener un papel específico en la interacción con superficies vegetales (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000). Igualmente, la adhesina OmpA de *E. coli* O157:H7 es necesaria para la unión a plántulas y semillas de alfalfa, según lo observado con el mutante *ompA*, que presenta sólo el 10% de la adhesión de la cepa silvestre (Torres *et al.*, 2005).

Los exopolisacáridos (EPS) también tienen un papel importante en la adhesión a superficies vegetales. Así, en *A. tumefaciens* mutantes *cel* y *chvB*, afectados en la producción de EPS de naturaleza celulósica, son deficientes en la adhesión a raíces de *A. thaliana* (Matthysse y McMahan, 1998) y de tomate (Matthysse *et al.*, 2005). La síntesis de celulosa también

es importante en *S. enterica*, ya que un mutante *bcsA*, defectivo en la síntesis de celulosa, presenta una menor adhesión a plántulas de alfalfa (Barak *et al.*, 2007). Asimismo, la mutación de un regulador negativo de la síntesis de alginato (*mucA*) en *P. fluorescens* CHA0, aumenta la síntesis del EPS, lo que ocasiona una mayor adhesión radicular (Bianciotto *et al.*, 2001). Las propiedades físico-químicas de la superficie celular también pueden ser importantes para la adhesión. Esto se ha demostrado con mutantes *yihO* de *S. enterica*, que son deficientes en la síntesis del antígeno-O y presentan una menor adhesión a plántulas de alfalfa (Barak *et al.*, 2007). Además, en *P. putida* KT2440, un mutante *galU*, que en *P. aeruginosa* se sabe que es defectivo en la síntesis del "core" lipopolisacárido (Lam *et al.*, 2004), está afectado en la adhesión a semillas de maíz (Yousef-Coronado *et al.*, 2008).

Siguiendo con el paralelismo establecido entre la formación de "biofilms" en superficies bióticas y abióticas, varios reguladores de *A. tumefaciens* se han relacionado con la formación de BPs en ambas superficies. Así, SinR es un regulador positivo necesario para el desarrollo de "biofilms" en superficies abióticas (Ramey *et al.*, 2004b). Mutantes *sinR* forman BPs mucho menos complejas que la cepa silvestre en raíces de *Arabidopsis* (Ramey *et al.*, 2004b). Por el contrario, BigR es un represor de la síntesis de "biofilms" en superficies abióticas y los mutantes *bigR* forman BPs con mayor biomasa que la cepa silvestre durante la colonización de raíces de tabaco (Barbosa y Benedetti, 2007). El desarrollo de una BP madura en superficies abióticas se ha asociado con la formación de una matriz exopolisacáridica (Friedman y Kolter, 2004a,b; Branda *et al.*, 2005; Ryder *et al.*, 2007). En relación con esto, la presencia de ERs provoca cambios en la composición de los EPS de *A. brasilense*, aumentando su proporción en arabinosa y xilosa (Fischer *et al.*, 2003). La formación de la matriz exopolisacáridica se ha observado durante la colonización de raíces de *Arabidopsis* y de plantas de albahaca por *P. aeruginosa* (Walker *et al.*, 2004). Además, en experimentos llevados a cabo durante la colonización de raíces de tomate, la superproducción de celulosa en *A. tumefaciens* da lugar a una BP más desarrollada (Matthysse *et al.*, 2005).

Como se ha mencionado anteriormente en esta introducción, la disgregación de bacterias desde la BP es la etapa que cierra el ciclo de formación del "biofilm" en superficies abióticas. Actualmente no existen

datos experimentales sobre el efecto que la disgregación de las BPs pueda tener sobre la colonización de la rizosfera. El único trabajo del que tengamos conocimiento se refiere al fitopatógeno foliar *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (*Xcc*). En este caso, un mutante en una enzima extracelular que hidroliza mananos tiene afectada su capacidad de disgregación de la BP y una menor virulencia. Los autores explican este fenotipo pleiotrópico como consecuencia de la baja capacidad de disgregación del mutante (Dow *et al.*, 2003).

4.4. Implicación del *quorum-sensing*

La gran densidad celular dentro de las BPs sugiere que tanto su desarrollo como la fisiología de las bacterias que las componen estén regulados por procesos dependientes de *quorum-sensing* (QS). Mediante QS las bacterias coordinan su expresión génica en respuesta a altos niveles de densidad celular a través de la síntesis de una serie de pequeñas moléculas señalizadoras (autoinductores o feromonas) que difunden a través de las membranas celulares. Se conocen distintos tipos de señales autoinductoras, aunque en proteobacterias son principalmente homoserín-lactonas (HSLs) (Williams *et al.*, 2007; y referencias citadas en éste). Una de las primeras evidencias de la existencia de HSLs en los "biofilms" en superficies abióticas surgió en unos estudios realizados por McLean y colaboradores (1997). A partir de ellos, numerosos datos experimentales destacan la importancia de los mecanismos dependientes de QS en la formación de las BPs (Zhu y Mekalanos, 2003; Sakuragi y Kolter, 2007; Patriquin *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2008; Riedel *et al.*, 2009). La producción de HSLs está ampliamente distribuída entre las rizobacterias (Cha *et al.*, 1998; Berg *et al.*, 2002; Danhorn y Fuqua, 2007; y referencias citadas en éste), habiéndose sugerido que su incidencia en *Pseudomonas* es mayor entre las bacterias aisladas de la raíz que en los aislados de suelo no rizosférico (Elasri *et al.*, 2001). Así, la síntesis de HSLs es habitual en bacterias presentes en la rizosfera de tomate (Steidle *et al.*, 2001) y trigo (Gantner *et al.*, 2006). Además, se sabe que estas moléculas pueden difundir hasta 37 y 78 μm en el ápice y los pelos radicales, respectivamente (Gantner *et al.*, 2006), lo que les otorga un interés ecológico. Se conoce un ejemplo, el de *P. fluorescens* 2P24, en el que se ha demostrado que las HSLs son fundamentales tanto

para la formación de BPs en superficies abióticas como para la colonización de la rizosfera (Wei y Zhang, 2006). No obstante, otros mecanismos diferentes a los mediados por señales diferentes a HSLs deben de ser importantes en la colonización de la rizosfera. Así, se conocen numerosos ejemplos de bacterias que son eficientes colonizadoras en condiciones gnotobióticas y que no sintetizan estas señales. Este es el caso de *P. putida* KT2440. Un mutante de esta bacteria en el gen *ddcA* cuya expresión está regulada por densidad celular está afectado en adhesión a la espermosfera de maíz (Espinosa-Urgel y Ramos, 2004) y es competitivamente deficiente en la colonización con respecto a la cepa silvestre (Fernández-Piñar *et al.*, 2008). Por último cabe mencionar que, junto a las moléculas señal producidas por bacterias asociadas a plantas, también las raíces de plantas de arroz, tomate, lechuga o *Arabidopsis* exudan compuestos que mimetizan las HSLs bacterianas. Esto les permite regular procesos dependientes de densidad como la síntesis de antibióticos o el "swarming" y sugiere un alto grado de coevolución en la interacción planta-bacteria (Teplitski *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2003 y 2007).

5. Tecnologías empleadas para el estudio de la expresión génica en la rizosfera

Durante la colonización y adaptación a la vida en la rizosfera, es previsible que las bacterias modifiquen su patrón de expresión génica como mecanismo adaptativo a la interacción que se establece con la planta. El estudio de la expresión génica en la rizosfera o en presencia de ERs se inició con el uso de fusiones transcripcionales a genes reporteros como *gfp*, *gusA*, *lacZ* o *luxAB* (Bloemberg *et al.*, 2007; y referencias citadas en éste). Así se identificaron promotores inducibles en la rizosfera (Egener *et al.*, 1998; Allaway *et al.*, 2001; Boldt *et al.*, 2004) o en presencia de ERs (Peters *et al.*, 1986; van Overbeek y van Elsas, 1995; Vílchez *et al.*, 2000; Espinosa-Urgel y Ramos, 2001; Dunn *et al.*, 2003). Posteriormente, se abordó el estudio de la expresión génica durante la interacción planta-bacteria mediante el empleo de tecnologías como IVET (del inglés, "In Vivo Expression Technology"). La tecnología IVET permite la identificación y el aislamiento de promotores activos "in vivo" en una situación concreta. La selección en la

rizosfera está basada en la necesidad de la expresión de un gen desprovisto de su promotor que es esencial para la supervivencia en este hábitat tales como *asd* o *dap* (Espinosa-Urgel y Ramos-González, 2004; y referencias citadas en éste). La utilización de IVET ha permitido hasta ahora el estudio de la expresión génica de *P. fluorescens* SBW25 en la rizosfera de remolacha (Rainey, 1999; Gal *et al.*, 2003; Silby *et al.*, 2009), de *P. putida* KT2440 en la rizosfera de maíz (Ramos-González *et al.*, 2005), de *Rashtonia leguminosarum* A34 en la rizosfera de guisante (Barr *et al.*, 2008) y de *P. stutzeri* A15 durante la colonización e infección de raíces de arroz (Rediers *et al.*, 2003). Estos análisis han identificado genes implicados en detoxificación de compuestos tóxicos, resistencia a estrés, metabolismo central, transporte, secreción, regulación génica global y funciones directamente relacionadas con la formación de BPs (QT, flagelo o formación de EPS). Sin embargo, el empleo de otras técnicas también ha permitido la identificación de genes relevantes en la interacción planta-bacteria. Langlois y colaboradores (2002), realizaron un análisis proteómico del saprófito Gram positivo *Streptomyces coelicolor* en presencia de la planta acuática *Lemna minor*, llegando a identificar variaciones en los niveles de treinta y una proteínas. Estas proteínas se categorizaron funcionalmente y se relacionaron con el metabolismo energético, el catabolismo de compuestos carbonados derivados de la planta y con la respuesta a estrés, lo que ilustra cambios para la adaptación fisiológica de la bacteria en respuesta a los ERs. Más recientemente se ha incorporado la tecnología de "microarrays" al estudio de la expresión génica en la rizosfera. Mark y colaboradores (2005) llevaron a cabo un estudio de la expresión génica de *P. aeruginosa* en presencia de ERs de plantas de remolacha. Más del 8% de los genes presentaron una alteración en su transcripción, incluyendo genes de metabolismo, motilidad, QT, síntesis de EPS o secreción.

5.1. Expresión génica en la rizosfera

Anteriormente en esta introducción se ha descrito la importancia de la utilización de nutrientes presentes en los exudados para la colonización eficiente de la rizosfera. La inducción de varios genes implicados en el metabolismo de estos nutrientes se ha observado en la rizosfera o en

presencia de ERs. Así, el gen *hutT* se identificó en un estudio IVET en la rizosfera de plantas de remolacha (Rainey, 1999). HutT está implicado en la utilización de histidina por *P. fluorescens* SBW25. También se ha observado la inducción transcripcional de genes de *P. putida* KT2440 implicados en el catabolismo de aminoácidos en presencia de ERs de maíz. Baste citar a *putA* (Vílchez *et al.*, 2000) y *davT* (Espinosa-Urgel y Ramos, 2001), necesarios para el catabolismo de la prolina y de la lisina, respectivamente. Además, una característica extendida de las rizobacterias es la capacidad de metabolizar una amplia variedad de compuestos aromáticos, muchos de ellos de origen vegetal (Kamath *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2006), y utilizarlos como fuente de carbono y energía (Jiménez *et al.*, 2002). Esto explicaría la inducción transcripcional de genes implicados en el catabolismo de estos compuestos que se observa en un análisis genómico en presencia de ERs (Mark *et al.*, 2005) o en la rizosfera mediante el empleo de la tecnología IVET (Gal *et al.*, 2003; Rieders *et al.*, 2003; Barr *et al.*, 2008). Los compuestos aromáticos pueden llegar a ser tóxicos para la bacteria y generar respuestas de estrés (Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006), por lo que su metabolización puede conferir una ventaja adaptativa a las bacterias durante la colonización de la rizosfera. Miché y colaboradores (2003) han observado que los ERs inducen la transcripción de genes implicados en la respuesta frente a choque térmico, tales como *dnaK* y *grpE*, o frente a diferentes estreses ambientales, como *uspA*. Ambos tipos de respuestas se establecen en presencia de compuestos aromáticos (Nyström y Neidhardt, 1994; Domínguez-Cuevas *et al.*, 2006). Se ha demostrado que la proteína PinA de *P. fluorescens* SBW25, cuyo gen se identificó mediante IVET (Gal *et al.*, 2003), presenta actividad nitrilasa. PinA detoxifica nitrilos producidos por la planta que pueden llegar a ser tóxicos para la bacteria, permitiendo así la colonización de tejidos en presencia de niveles elevados de estos nitrilos (Howden *et al.*, 2009). Sin embargo, uno de los principales estreses a los que se someten las bacterias en la rizosfera es el estrés oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, "Reactive Oxygen Species") presentes en la raíz tales como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), ión superóxido (O₂^{•-}) y el radical hidroxilo (OH[•]), son donadores de electrones que intervienen en procesos de transducción de señal en respuesta a situaciones de estrés (Liszkay *et al.*, 2004; Perry *et al.*, 2007) o en el

crecimiento y diferenciación radicular (Dunand *et al.*, 2007). Se ha propuesto que es en respuesta a la producción de ROS, por lo que aparecen inducidos en la rizosfera una serie de genes que codifican peroxidasas (Rainey, 1999; Miché *et al.*, 2003; Rediers *et al.*, 2003), glioxilasas (Rainey, 1999) o superóxido dismutasas (Kim *et al.*, 2000; Langlois *et al.*, 2003; Miché *et al.*, 2003).

En cuanto al metabolismo energético en la rizosfera, se identificó la inducción transcripcional de los operones *nuo* y *ndh*, que codifican respectivamente las NADH deshidrogenasas NDH-1 y NDH-2 de *P. fluorescens* WCS365. NDH-1 y NDH-2 muestran diferente especificidad de sustratos y sensibilidad a inhibidores, junto con una expresión diferencial en función de la tensión superficial de oxígeno (Camacho-Carvajal *et al.*, 2002). Además, únicamente NDH-1 puede generar gradiente de protones (Matsushita *et al.* 1987) y es necesario para una colonización competitiva eficiente del ápice radicular y para un crecimiento competitivo en ERs (Camacho-Carvajal *et al.*, 2002). Los autores sugieren que WCS365 requiere de la producción de energía dependiente de NDH-1 para la supervivencia en las condiciones ambientales reinantes en la rizosfera.

Conviene también mencionar la identificación, mediante IVET y fusiones a genes reporteros, de la inducción transcripcional de genes *rsp* de *P. fluorescens* SBW25 en la rizosfera de *Arabidopsis* (Jackson *et al.*, 2005). Las proteínas Rsp muestran una elevada similitud a los sistemas de secreción de tipo III (TTSS) de *P. syringae* y *Erwinia amylovora* (Preston *et al.*, 2001). Estos sistemas de secreción están implicados en el ensamblaje de flagelos, secreción e inyección de proteínas en el interior de células eucariotas promoviendo simbiosis mutualistas o patogénesis (Preston, 2007). Sin embargo, su función biológica en PGPRs tales como *P. fluorescens* SBW25 es desconocida, aunque se ha propuesto su implicación en la adaptación al crecimiento en asociación con la planta (Somers *et al.*, 2004).

En *P. fluorescens* F113, los genes que codifican las recombinasas específicas de sitio Sss y XerD se inducen en la rizosfera de plantas de alfalfa, pero no se inducen en presencia de ERs (Martínez-Granero *et al.*, 2005). Estas recombinasas son las responsables de la aparición de variantes fenotípicas durante la colonización de la rizosfera de alfalfa por *P. fluorescens* F113 (Sánchez-Contreras *et al.*, 2002). La aparición de

variantes fenotípicas es habitual durante la colonización de la rizosfera y genera diversidad genética que permite una mejor adaptación al ambiente complejo rizosférico (Achouak *et al.*, 2004; van den Broek, *et al.*, 2005). Así, mutantes *sss* (Dekkers *et al.*, 1998b; Martínez-Granero *et al.*, 2005) y *xerD* (Martínez-Granero *et al.*, 2005) en *P. fluorescens* están afectados en la colonización de ápices radiculares. El análisis de las variantes fenotípicas surgidas durante la colonización de la rizosfera indica que presentan una mayor motilidad y alguna de estas variantes se caracteriza por tener una mayor capacidad competitiva que la cepa silvestre (Martínez-Granero *et al.*, 2006). Además, en ellas se observó una aparición preferencial de mutaciones en el sistema de dos componentes GacS/GacA (Martínez-Granero *et al.*, 2005, 2006). La aparición de mutaciones en este sistema se ha observado que es frecuente en la rizosfera (Chancey *et al.*, 2002; Sánchez-Contreras *et al.*, 2002).

La inducción de reguladores transcripcionales, que permiten a las células responder a estímulos ambientales y modular cambios en la expresión génica, es también frecuente en la rizosfera (Rainey, 1999; Gal *et al.*, 2003; Rediers *et al.*, 2003; Ramos-González *et al.*, 2005; Barr *et al.*, 2008). En cambio, el número de reguladores estudiados en la rizosfera es escaso. Un ejemplo es el gen *colS*, del sistema de dos componentes ColS/ColR, que se identificó mediante IVET en *P. putida* KT2440 por su inducción en la rizosfera de maíz (Ramos-González *et al.*, 2005). En *P. fluorescens* WCS365, un mutante *colS* (Dekkers *et al.*, 1998a), junto con mutantes en dos genes de su regulón que codifican una metiltransferasa y la heptosa quinasa WapQ (de Weert *et al.*, 2006), están afectados en colonización competitiva de ápices radiculares de tomate. Además, un mutante *colS* presenta menor capacidad competitiva que la cepa silvestre durante el crecimiento en ERs de tomate (de Weert *et al.*, 2006). Los autores sugieren un modelo en el cual la metiltransferasa y WapQ actuarían modificando el estado de metilación y de fosforilación de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa celular, alterando las propiedades físico-químicas de la membrana. Estas modificaciones serían las responsables de las diferencias en la capacidad competitiva y en la mayor resistencia frente a antibióticos observada en los mutantes *colS* (de Weert *et al.*, 2006). Recientemente, se ha descrito la activación transcripcional del locus PA4753 de *P. aeruginosa*

en presencia de ERs. Este locus codifica una proteína de función desconocida con un dominio de unión a ARN cuyo mutante PA4753 está afectado en la colonización competitiva (Mark *et al.*, 2005). Sin embargo, su ortólogo en *R. solanacearum* GMI1000, el gen que codifica Rsc1524, reprime su transcripción en presencia de ERs de plantas como tomate, remolacha, trigo o *Arabidopsis* (Franks *et al.*, 2008).

En otra serie de estudios, Barr y colaboradores (2008), mediante un análisis IVET de la expresión génica de *R. leguminosarum* A34 en la rizosfera de guisante identificaron dos genes que codifican proteínas sensoras con dominios GGDEF y EAL. Estos dominios controlan el metabolismo del segundo mensajero bacteriano diguanilato cíclico (di-GMPc) y están implicados en la transición de sesilidad a motilidad (Simm *et al.*, 2004; Römling y Amikan, 2006).

6. Metabolismo del di-GMPc en la célula bacteriana

La estructura molecular del bis-(3',5')-monofosfato de guanosina cíclico (di-GMPc) (Figura 7) y su presencia en bacterias se documentó por primera vez por el grupo de Benziman (Ross *et al.*, 1987), después de detectar su papel como activador alostérico de la enzima celulosa sintasa en *Gluconacetobacter xylinus* (Ross *et al.*, 1985, 1991). Posteriormente, Hecht y Newton (1995) relacionaron el regulador de respuesta PleD con la pérdida de motilidad y los cambios morfológicos que ocurren durante el ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. PleD tiene un dominio GGDEF que presentaba una alta identidad con los dominios existentes en otras seis proteínas bacterianas de función desconocida. Sin embargo no fue hasta 1998 cuando se estableció la primera relación entre el metabolismo del di-GMPc y proteínas con dominios GGDEF y EAL (Tal *et al.*, 1998). Actualmente se conoce que estas proteínas están distribuidas ampliamente en multitud de genomas bacterianos, principalmente en bacterias Gram negativas, mientras que están ausentes en arqueas y eucariotas (Galperin, 2004; Hengge, 2009).

La síntesis y degradación del di-GMPc está catalizada por enzimas con actividad diguanilato ciclasa (DGC) y fosfodiesterasa (PDE), respectivamente. Los dominios GGDEF presentan actividad DGC, mientras

que los dominios EAL y HD-GYP son los responsables de la actividad PDE (Hengge *et al.*, 2009) (Fig. 7). Aunque estos dominios tengan una longitud comprendida entre 170 y 240 aminoácidos (Galperin *et al.*, 2001; Römling *et al.*, 2005), la nomenclatura proviene de la conservación aminoacídica de sus centros activos. La presencia íntegra de las secuencias GGDEF (o su variante GGEEF), EAL y HD-GYP son importantes para mantener la actividad DGC o PDE. Múltiples estudios han demostrado que la generación de mutaciones puntuales en alguno de los residuos de los dominios, elimina la actividad enzimática de la proteína (Tamayo *et al.*, 2005; Tischler y Camilli, 2005; Gjermansen *et al.*, 2006; Ryan *et al.*, 2006; Kim y McCather, 2007; Paul *et al.*, 2007). Sin embargo, esta actividad enzimática no siempre se puede predecir en función de la conservación de la secuencia aminoacídica en el centro activo. En un estudio de Kulasakara y colaboradores (2006) llevado a cabo en *P. aeruginosa*, únicamente se detectó actividad PDE en cuatro de cinco proteínas con dominio EAL y actividad DGC en siete de diecisiete proteínas con dominio GGDEF. Asimismo, sólo una de las dieciséis proteínas duales GGDEF/EAL presentó actividad enzimática, independientemente de la conservación íntegra de los aminoácidos indispensables para la actividad de los dominios.

La primera evidencia bioquímica de la actividad DGC en proteínas con dominios GGDEF se obtuvo mediante la purificación del regulador de respuesta PleD en *C. crescentus*. La proteína PleD sintetiza di-GMPc a partir de dos moléculas de GTP en un proceso dependiente de la fosforilación de su dominio receptor N-terminal (Fig. 7) (Paul *et al.*, 2004). En cuanto a la actividad PDE, mediante la purificación del dominio EAL de la proteína YahA de *E. coli*, se demostró su actividad PDE "in vitro", sin que fuera necesario el requerimiento de ningún otro dominio proteico (Schmidt *et al.*, 2005). En la reacción que cataliza la PDE, el dominio EAL hidroliza di-GMPc al dinucleótido lineal 5'-fosfoguanilil (3'-5')-guanosina (pGpG), (Römling *et al.*, 2005). Esta actividad depende de la presencia de cationes divalentes tales como Mg^{+2} o Mn^{+2} , mientras que se inhibe por la presencia de Ca^{+2} o Zn^{+2} (Christen *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2005). La degradación de pGpG a dos moléculas de GMP se cataliza por la acción de fosfodiesterasas inespecíficas, siendo las proteínas con dominios EAL muy ineficientes para esta actividad enzimática y probablemente no tengan relevancia fisiológica

(Römling *et al.*, 2005). Recientemente, como ya había sugerido Galperin y colaboradores (2001), se ha descrito la existencia de un segundo dominio con actividad PDE específica sobre di-GMPc, el dominio HD-GYP (Ryan *et al.*, 2006). Las proteínas con este dominio son capaces de romper el enlace fosfodiéster de di-GMPc, generando pGpG que posteriormente degradan a dos moléculas de GMP (Tamayo *et al.*, 2007) (Fig. 7).

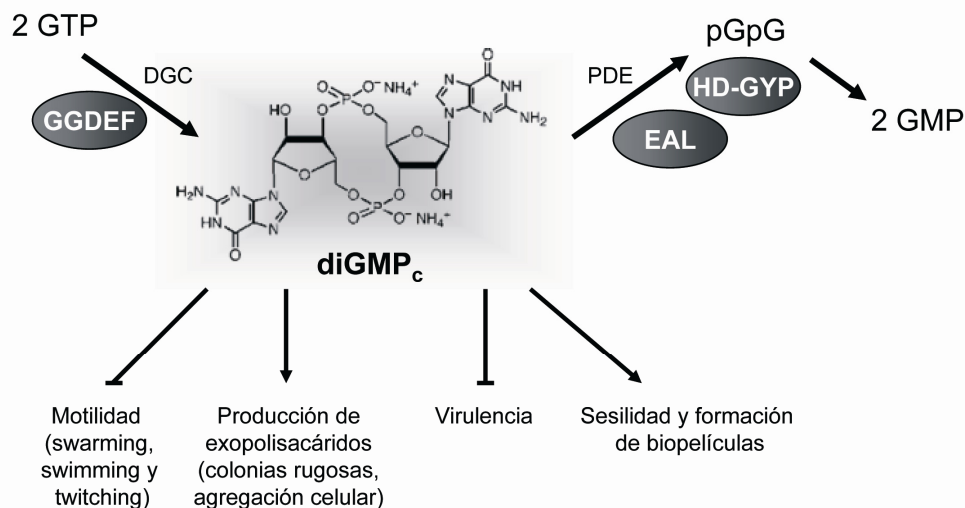


Figura 7. Metabolismo y fenotipos regulados por di-GMPc. Las proteínas con dominios GGDEF, que presentan actividad diguanilato ciclasa (DGC), sintetizan di-GMPc a partir de 2 moléculas de GTP. La actividad fosfodiesterasa (PDE) de los dominios EAL, hidroliza di-GMPc al dinucleótido lineal (pGpG). Posteriormente, pGpG es degradado a 2 moléculas de GMP por la acción de fosfodiesterasas inespecíficas. El dominio HD-GYP también presenta actividad PDE e hidroliza di-GMPc a 2 moléculas de GMP. En general, concentraciones intracelulares elevadas de di-GMPc promueven la síntesis de exopolisacáridos, un aumento en la capacidad de formar biopelículas, una morfología rugosa de las colonias o la agregación celular. A la inversa, la disminución de los niveles del segundo mensajero aumenta la motilidad y virulencia bacteriana. Adaptado de Hengge (2009).

Una de las características relevantes de las proteínas con actividades enzimáticas DGC y PDE es su naturaleza multimodular. Es frecuente que los dominios GGDEF, EAL o HD-GYP aparezcan asociados en su extremo N-terminal, a módulos que les permiten sentir una serie de señales ambientales tales como la luz (ej. BLUF) o moléculas gaseosas (ej. PAS o PAC). Estos módulos también responden a señales intracelulares como la fosforilación (ej. REC o CheY), unión de proteínas o péptidos (ej. CHASE) o nucleótidos y nucleósidos (ej. GAF o cNMP), entre otros. Estas señales pueden integrarse y ser transmitidas a través de dominios presentes en el

extremo C-terminal tales como el HTH de unión a ADN (Galperin *et al.*, 2001; Römling *et al.*, 2005; y referencias citadas en éstos). Muchas de estas proteínas poseen regiones transmembrana, que permiten la localización de los módulos sensores en el espacio periplásmico. La integración de estas señales permite a la bacteria modificar los niveles intracelulares de di-GMPc (Römling *et al.*, 2005; y referencias citadas en éste).

Cuando los dominios GGDEF, EAL y HD-GYP aparecen localizados en tándem dentro de la misma proteína, el dominio GGDEF suele estar en el extremo N-terminal (Römling *et al.*, 2005). En la mayoría de los casos, estas proteínas no presentan las dos actividades enzimáticas, ni "in vivo", ni cuando se ensaya su actividad "in vitro" (Christen *et al.*, 2005; Kulasakara *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006; Kuchma *et al.*, 2007). Sin embargo, la presencia de ambos dominios sugirió la posibilidad de que ambos sean activos, permitiendo una regulación más precisa de los niveles de di-GMPc. Aunque esto ya se había sugerido "in vivo" (Römling *et al.*, 2005), la primera evidencia experimental "in vitro" de la doble actividad DGC-PDE se obtuvo con el fitocromo BphG1 de *Rhodobacter sphaeroides* (Tarutina *et al.*, 2006). La proteína BphG1 presenta actividad PDE. Sin embargo, la delección de su dominio EAL ocasiona la aparición de actividad DGC "in vitro" en respuesta a la percepción de luz (Tarutina *et al.*, 2006). La presencia de dos actividades enzimáticas también se ha observado "in vivo" en la proteína ScrC de *Vibrio parahaemolyticus* (Ferreira *et al.*, 2008) e "in vitro" en la proteína MSDGC-1 de *Mycobacterium smegmatis* (Kumar y Chatterji, 2008).

En la vía de transducción de señales en la que interviene el di-GMPc, las proteínas con actividad DGC y PDE pueden responder a diferentes estímulos a través de su dominio sensor N-terminal. Estas señales pueden provocar la activación o la inhibición enzimática de la proteína, provocando la alteración de los niveles intracelulares del segundo mensajero. Actualmente se conocen varios efectores celulares que pueden unir di-GMPc y responder a las variaciones en su concentración (Hengge, 2009; y referencias citadas en éste). Así, la unión del segundo mensajero al efector ser responsable de que éste interactúe con una molécula o estructura diana dando lugar a alteraciones transcripcionales, si el efector es un regulador transcripcional (Hickman y Harwood, 2008), regulando actividades enzimáticas (Oglesby *et*

al., 2008) o el funcionamiento de estructuras celulares complejas como los flagelos (Pesavento *et al.*, 2008).

6.1. Fenotipos regulados por di-GMPc

La enorme diversidad de proteínas con actividad DGC o PDE codificadas en los genomas bacterianos sugiere que los procesos celulares controlados por este segundo mensajero puedan ser muy variables. En términos generales, niveles elevados de di-GMPc promueven la formación de EPS (Lee *et al.*, 2007; Bobrov *et al.*, 2008; Nakhamchik *et al.*, 2008) y BPs (Hickman *et al.*, 2005; Gjermansen *et al.*, 2006; Kuchma *et al.*, 2007; Nakhamchik *et al.*, 2008), confieren una morfología de colonia rugosa (Simm *et al.*, 2004; Gjermansen *et al.*, 2006; Beyhan y Yildiz, 2007), desencadenan procesos de QS (Andrade *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2008), e inhiben la motilidad celular (Kazmierczak *et al.*, 2006; Kim y McCarter, 2007; Pesavento *et al.*, 2008) y la virulencia (Tischler y Camilli, 2005; Ryan *et al.*, 2006, 2007), (Fig. 7). En este contexto cabría mencionar un trabajo en el que la delección de los doce genes que codifican proteínas GGDEF en *S. enteritidis* 3934 inhibe la síntesis de celulosa, la formación de fimbrias y "biofilm", además de la motilidad y la virulencia. Mediante el reclutamiento individual de genes con dominio GGDEF se ha demostrado que un único gen, *stm4551*, complementa la mayoría de los fenotipos. De éstos, el único que requirió el segundo mensajero fue la síntesis de celulosa, mientras que el resto están regulados de manera independiente a la síntesis de di-GMPc (Solano *et al.*, 2009).

El primer fenotipo asociado a la síntesis de di-GMPc, como ya se ha citado anteriormente, fue el relacionado con su papel como activador alostérico de la celulosa (Ross *et al.*, 1985; 1987). La inducción de la síntesis de EPS es uno de los principales fenotipos asociados con el aumento de la concentración intracelular de di-GMPc. Así, la generación de un mutante *adrA*, elimina la capacidad de *Salmonella typhimurium* 14028 de sintetizar celulosa. Esta mutación se consiguió complementar, no sólo mediante la introducción del gen silvestre en multicopia, sino mediante la introducción de otros genes como *gcpA*, *gcpB*, *gcpC* o *gcpF*, que codifican proteínas con dominios GGDEF (García *et al.*, 2004). Otro ejemplo claro se

produce a través de la mutación del gen *wspF* en *P. aeruginosa*. Este mutante presenta una fosforilación constitutiva de la diguanilato ciclasa WspR, que aumenta los niveles intracelulares de di-GMPc y como consecuencia tiene lugar la inducción transcripcional de los genes *psl* y *pel* de síntesis de EPS (Hickman *et al.*, 2005). En la misma bacteria, la síntesis de alginato está regulada por el regulador MucR, una proteína dual GGDEF/EAL, de modo que su delección disminuye la producción de este EPS cerca de cuarenta veces (Oglesby *et al.*, 2008; Hay *et al.*, 2009).

La morfología rugosa de las colonias aparece generalmente asociada a un aumento en la síntesis de EPS, resultando en la aparición de colonias altamente estructuradas (Lim *et al.*, 2006, 2007; Güvener y Harwood, 2007; Nakhmchik *et al.*, 2008). La síntesis de EPS, como se ha citado anteriormente en esta Introducci3n, es importante para el desarrollo de una conducta multicelular como es el "biofilm". Simm y colaboradores (2004) correlacionaron el aumento de los niveles intracelulares de di-GMPc en *S. typhimurium* con el incremento en la producci3n de celulosa y con una mayor formaci3n de BPs. Un ejemplo bien conocido es la regulaci3n positiva de la síntesis de EPS a través de VpsR en *Vibrio cholerae*. Aquí, la proteína con actividad PDE VieA disminuye los niveles de di-GMPc y reprime indirectamente la transcripci3n de *vpsR*. En consecuencia, disminuye la síntesis de EPS y con ella la formaci3n de BPs (Tischler y Camilli, 2004; Martínez-Wilson *et al.*, 2008). Existen otros factores independientes a la síntesis de EPS mediante los cuales el di-GMPc regula la formaci3n de BPs. Así, en *P. fluorescens*, la proteína LapD está implicada en la localizaci3n en la superficie celular de la adhesina LapA, indispensable para la formaci3n de BPs en superficies abi3ticas (Hinsa *et al.*, 2003; Hinsa y O'Toole, 2006). LapD presenta dominios citoplasmáticos GGDEF y EAL sin actividad enzimática, pero su dominio EAL mantiene la capacidad de unir di-GMPc (Newell *et al.*, 2009). Se ha propuesto un modelo de senalizaci3n transmembrana en el cual LapD sensora la concentraci3n intracelular del segundo mensajero, generando un cambio conformacional en su dominio HAMP periplásmico. La estabilizaci3n de LapA en la superficie celular dependería de este proceso (Newell *et al.*, 2009).

Altos niveles de di-GMPc se correlacionan con la disminuci3n de distintos tipos de motilidad tales como "swimming" (Gjermansen *et al.*, 2006;

Martínez-Wilson *et al.*, 2008; Pesavento *et al.*, 2008), "swarming" (Kim y McCarter, 2007; Kuchma *et al.*, 2007) o "twitching" (Kazmierczak *et al.*, 2006). Una de las primeras evidencias de la implicación de di-GMPc en la motilidad se obtuvo estudiando el gen *fimX* de *P. aeruginosa* (Huang *et al.*, 2003). FimX es una proteína dual GGDEF/EAL que sólo que presenta actividad PDE "in vitro", aunque con una baja eficiencia catalítica (Kazmierczak *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2008). Un mutante *fimX* muestra una motilidad tipo "twitching" reducida, debido a que presenta un menor número de pili de tipo IV en la superficie celular (Kazmierczak *et al.*, 2006). En *Vibrio fischeri*, el "swimming" depende de la presencia de Mg^{+2} en el medio (O'Shea *et al.*, 2006). En ausencia de Mg^{+2} , mutantes en dos reguladores negativos de la síntesis de flagelina, MifA y MifB, restauran la motilidad. Ambas proteínas tienen actividad DGC. Con respecto a la motilidad en superficie, un mutante *bifA* de *P. aeruginosa* es defectivo en la motilidad tipo "swarming". La proteína BifA presenta actividad PDE, de tal modo que el mutante tiene niveles elevados de di-GMPc (Kuchma *et al.*, 2007).

Anteriormente en esta Introducción se ha mencionado la necesidad de la motilidad durante los primeros estadios de la formación del "biofilm". Además, Klausen y colaboradores (2003a) demostraron la necesidad de una subpoblación móvil de bacterias para la formación de una BP estructurada. Ante esto, que altos niveles de di-GMPc activen la formación de las BPs e inhiban la motilidad parece contradictorio. Así, algunos autores sugieren que el di-GMPc actúa regulando la transición de motilidad a sesilidad (Simm *et al.*, 2004; Römling y Amikan, 2006; Tamayo *et al.*, 2007). De esta forma, se especula que los niveles del segundo mensajero habrían de ser bajos durante las primeras etapas de la formación de la BP y aumentarían posteriormente permitiendo el desarrollo de una BP madura (Fig. 8).

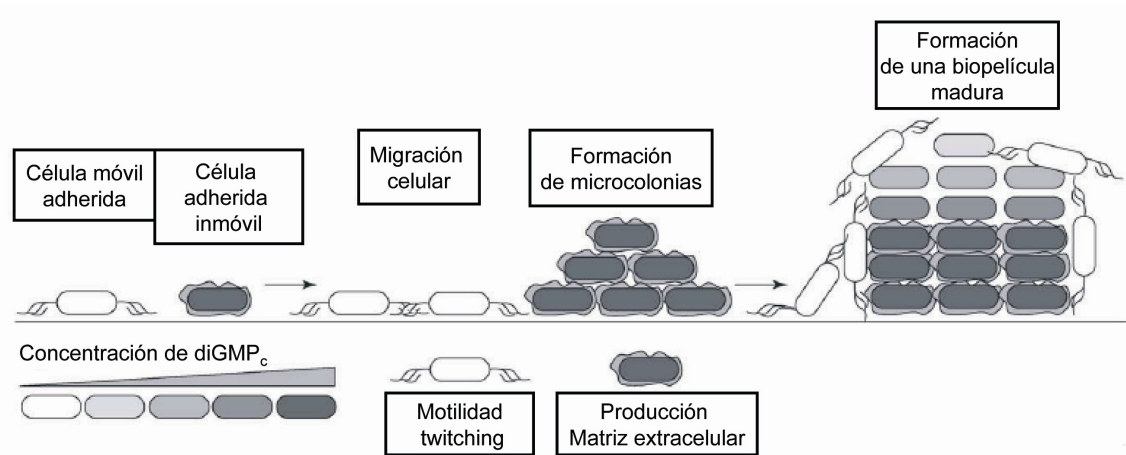


Figura 8. Modelo de la concentración intracelular de di-GMPc durante la formación de una biopelícula (BP). La regulación individualizada de la motilidad bacteriana es importante para el desarrollo una BP estructurada (Klausen *et al.*, 2003a). De esta forma, las células adheridas a una superficie, o que forman parte de una BP, podrían presentar diferentes concentraciones intracelulares de di-GMPc, dependiendo de si muestran un movimiento activo (ej. "twitching") o si están embebidas en una matriz exopolisacáridica. Obtenido de Römling y Amikan (2006).

El di-GMPc regula también otros procesos relacionados con la virulencia además de la motilidad (Cotter y Stibitz, 2007; Tamayo *et al.*, 2007; y referencias citadas en éstos). Así, en *V. cholerae*, la síntesis de la toxina del cólera está regulada positivamente por la actividad PDE de VieA (Tischler y Camilli, 2005; Martínez-Wilson *et al.*, 2008). En la bacteria fitopatógena *Xcc*, mutaciones independientes en trece genes que codifican proteínas GGDEF/EAL/HD-GYP disminuyen la capacidad infectiva de la bacteria. Cinco de estos mutantes presentaron una disminución en la síntesis de factores de virulencia extracelulares tales como endoglucanasas y endomananasas (Ryan *et al.*, 2007).

6.2. Regulación de los niveles intracelulares de di-GMPc

Dentro de un genoma bacteriano, el número de genes que codifican proteínas con dominios GGDEF, EAL o HD-GYP puede ser muy elevado (Ulrich y Zhulin, 2007). Ello sugiere una gran complejidad en las vías de señalización dependientes de di-GMPc en la bacteria. Excepcionalmente se conoce la contribución que cada una de las proteínas puede hacer a los niveles intracelulares de di-GMPc. En *C. crescentus*, la proteína CC3396 es responsable del 80% de la actividad PDE (Christen *et al.*, 2005); en *P.*

aeruginosa, BifA reduce a la mitad los niveles intracelulares de di-GMPc (Kuchma *et al.*, 2007); en *Acetobacter xylinum*, la diguanilato ciclasa 1 (DGC-1) contribuye al 80% de su actividad DGC total (Tal *et al.*, 1998).

Se han descrito varios mecanismos responsables de la modulación de la concentración intracelular del segundo mensajero. El primer mecanismo es a través de la regulación de la expresión génica. Quince de los veintiocho genes que en *E. coli* W3110 codifican proteínas GGDEF/EAL están regulados transcripcionalmente por σ^{38} y en esta regulación intervienen variables como la temperatura o el pH (Sommerfeldt *et al.*, 2009). Además, la transcripción de las proteínas GGDEF/EAL puede verse afectada si estas proteínas están integradas en vías de transducción de señal en las que intervienen otras proteínas GGDEF/EAL, tal como ocurre con CdgC de *V. cholerae*. Esta proteína dual GGDEF/EAL regula positivamente la transcripción de HapR, un regulador transcripcional de QS (Lim *et al.*, 2007). HapR controla a su vez la transcripción de otros genes que codifican proteínas con dominios GGDEF, EAL o HD-GYP (Waters *et al.*, 2008; Hammer y Bassler, 2009). Un ejemplo de regulación postranscripcional de genes que codifican proteínas con dominios GGDEF lo constituyen YcdT e YdeH, represores de la motilidad tipo "swimming" en *E. coli*. El regulador global CsrA se une con alta afinidad a sus transcritos disminuyendo su vida media. Así, un mutante *csrA* presenta un incremento de más de diez veces en los niveles de ARN_m de *ycdT* y *ydeH* (Jonas *et al.*, 2008). La síntesis de di-GMPc parece estar también regulada a nivel proteolítico por las proteasas ClpXP y Lon siendo ésta la causa que proponen Perry y colaboradores (2004) para que los niveles de la proteína con dominio GGDEF HmsT de *Yersinia pestis*, sean altos por encima de 37°C.

Un segundo mecanismo de regulación de di-GMPc es mediante la modulación de la actividad enzimática que se ejerce a través de los dominios sensores, en respuesta a estímulos ambientales o intracelulares. Por ello, es frecuente que las proteínas implicadas en el metabolismo de di-GMPc formen parte de un sistema de dos componentes. Así, la proteína Rrp1 de *Borrelia burgdorferi* regula su actividad DGC en función del estado de fosforilación de su dominio REC, a través de Hpk1, una quinasa sensora asociada (Ryjenkov *et al.*, 2005). De manera similar se regula la actividad PDE de VieA por VieS, que regula la virulencia de *V. cholerae*. Esta

fosforilación, además de conferir actividad PDE a VieA, es responsable de regular la expresión del operón *vieSAB* a través del dominio HTH presente en el extremo C-terminal de VieA (Martínez-Wilson *et al.*, 2008). Asimismo, la dimerización de PleD en *C. crescentus*, y con ella la adquisición de su conformación activa, también requiere de la fosforilación de su dominio REC (Paul *et al.*, 2004, 2007).

Otra forma de regulación con la que se especula es la distribución espacio-temporal heterogénea de los niveles de di-GMPc. Una de las primeras evidencias de la existencia de estas variaciones se obtuvo estudiando la localización intracelular de PleD, mediante el empleo de fusiones traduccionales a GFP. Durante la transición al estilo de vida sésil de *C. crescentus*, la fosforilación de PleD no sólo origina una conformación activa de la proteína, como hemos comentado anteriormente, sino que también posibilita su relocalización en posiciones polares de la célula, cerca de la base del flagelo (Paul *et al.*, 2004). La heterogeneidad espacial del segundo mensajero en la célula también se ha propuesto en otros estudios (Christen *et al.*, 2005; Gjermansen *et al.*, 2006; Kader *et al.*, 2006; Güvener *et al.*, 2007). Recientemente, esta hipótesis se ha puesto en duda por Solano y colaboradores (2009). Estos autores observaron que varias proteínas con dominios GGDEF pueden complementar el mismo fenotipo exhibido por un mutante nulo de *S. enteritidis* en todas las proteínas GGDEF.

Por último, un cuarto nivel de control de los niveles de di-GMPc es la regulación alostérica de las actividades enzimáticas DGC y PDE. Paul y colaboradores (2004) observaron inhibición en la actividad DGC de la proteína PleD purificada en presencia de di-GMPc, lo que sugería una posible competitividad entre el sustrato natural (GTP) y el producto (di-GMPc) por el mismo sitio activo de la enzima. La cristalización de PleD en presencia de di-GMPc (Chan *et al.*, 2004) condujo a la identificación de una región próxima al centro activo, denominada región I, capaz de unir di-GMPc. Esta unión provoca una inhibición alostérica de la actividad DGC, lo que descartó la competición entre GTP y di-GMPc por el sitio activo. La región I es frecuente en proteínas con dominios GGDEF y se caracteriza por su ubicación cinco aminoácidos antes al motivo GGDEF y por tener un motivo RxxD altamente conservado en su secuencia aminoacídica (Christen

et al., 2006). Existe también la posibilidad de que en proteínas duales GGDEF/EAL (o HD-GYP), alguno de los dominios GGDEF o EAL pueda regular la actividad enzimática del otro dominio vecino. Este es el caso de la proteína CC3396 de *C. crescentus*, que tiene un motivo GEDEF sin actividad enzimática, pero que mantiene su capacidad de unión de GTP. Esta unión regula alostéricamente la actividad PDE del dominio EAL, aumentando su afinidad por di-GMPc e incrementando así su degradación (Christen *et al.*, 2005).

6.3. Efectores celulares en las vías de señalización de di-GMPc

Para ejercer su papel, el segundo mensajero debe de unirse a una molécula efectora. Esta unión puede alterar la conformación alostérica del efector y regular su función en la célula bacteriana. Actualmente se conocen cuatro dominios proteicos que unen di-GMPc. Las primeras evidencias experimentales que apuntaron a los dominios PilZ se obtuvieron con mutantes en proteínas con estos dominios. Estos mutantes presentaban el mismo fenotipo que al mutar genes que codifican proteínas GGDEF/EAL (Alm *et al.*, 1996; Mejía-Ruiz *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2003). Así, se han identificado proteínas con dominios PilZ que están implicadas en motilidad (Ryjenkov *et al.*, 2006; Christen *et al.*, 2007), formación de BPs (Pratt *et al.*, 2007; Ramelot *et al.*, 2007), virulencia (Benach *et al.*, 2007; Pratt *et al.*, 2007) o síntesis de EPS (Merighi *et al.*, 2007). Amikam y Galperin (2006) realizaron un análisis "in silico" que confirmó que los dominios PilZ están ampliamente distribuidos en los genomas bacterianos. Actualmente existen estudios en los que se demuestra su capacidad de unir di-GMPc mediante técnicas de diálisis de equilibrio (Ryjenkov *et al.*, 2006) y calorimetría de titulación isotérmica (Benach *et al.*, 2007). La estructura cristalina de VCA0042 de *V. cholerae* en presencia del segundo mensajero ha permitido dar a conocer que el di-GMPc interacciona con siete de los nueve residuos conservados en el dominio PilZ (Benach *et al.*, 2007). Además, la sustitución de alguno de estos residuos puede ocasionar una disminución de hasta un 90% en la capacidad de unión a di-GMPc (Pratt *et al.*, 2007). Otra proteína efectora de di-GMPc es el regulador transcripcional FleQ de *P. aeruginosa*. FleQ activa la expresión de genes de biosíntesis de

flagelo (Arora *et al.*, 1997; Dasgupta *et al.*, 2003), mientras que reprime la transcripción de los genes *pel* de biosíntesis de EPS (Hickman y Harwood, 2008). Mediante ensayos de retardo en gel, se ha demostrado que la represión existente sobre los genes *pel* se libera a través de la unión de di-GMPc a FleQ (Hickman y Harwood, 2008). Recientemente, se ha identificado una tercera proteína efectora, PelD, que a través de su unión a di-GMPc activa la síntesis de EPS. Esta unión es muy específica y requiere de la presencia de tres residuos conservados en el extremo C-terminal (Lee *et al.*, 2007). El análisis de la secuencia de PelD también evidencia la presencia de un motivo RxxD. Sin embargo, la ausencia de un dominio GGDEF en PelD sugiere su pertenencia a una nueva familia de proteínas de unión a di-GMPc (Lee *et al.*, 2007).

Además de la existencia de dominios proteicos, también se había hipotetizado sobre la existencia de "riboswitches" de di-GMPc, que son dominios en el ARN_m que unen este segundo mensajero, haciendo así posible la regulación de la expresión génica (Tamayo *et al.*, 2007). Sudarsan y colaboradores (2008) descubrieron el "riboswitch" Vc2 presente en la región 5' del locus VC1722 en *V. cholerae*. La unión de di-GMPc a esta región es muy estable, casi 3 órdenes de magnitud mayor que la unión al dominio PilZ de la proteína YcgR de *E. coli* (Ryjenkov *et al.*, 2006). Un aumento en los niveles intracelulares de di-GMPc incrementa la expresión de VC1722, mediante la unión del segundo mensajero a Vc2, y promueve una morfología de colonia rugosa (Sudarsan *et al.*, 2008). Aunque estos "riboswitches" sólo se han detectado en *V. cholerae* y *Clostridium difficile* (Sudarsan *et al.*, 2008), no se descarta la existencia de estructuras similares en otras bacterias.

II. OBJETIVOS

Durante la colonización de la rizosfera es previsible que las bacterias alteren su patrón de expresión génica como un mecanismo adaptativo a la interacción que establecen con la planta. El número de estudios que analizan el control génico de la colonización en el hábitat rizosférico es muy limitado. *Pseudomonas putida* KT2440 es una eficaz colonizadora de la rizosfera de plantas con alto interés agronómico (Molina *et al.*, 2000) y para la que se disponen de múltiples herramientas de manipulación genética. La secuenciación del genoma de esta cepa (Nelson *et al.*, 2002), la existencia de una colección de mutantes (PRCC, Duque *et al.*, 2007) y de la tecnología de microarrays, así como los estudios previos en nuestro Grupo de Investigación, han contribuido a la elección de *P. putida* KT2440 como organismo modelo de esta Tesis Doctoral. Antes de su inicio, el estudio de la expresión génica de esta cepa en la rizosfera se había abordado mediante el empleo de la tecnología IVET. Dicho análisis permitió identificar veintiocho genes con expresión preferencial en este hábitat (Ramos-González *et al.*, 2005). Con el fin de identificar nuevos determinantes genéticos relacionados con la supervivencia de *P. putida* KT2440 en la rizosfera y esclarecer los beneficios derivados de la interacción con la planta, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Analizar la expresión génica global de esta cepa durante la colonización.
2. Evaluar su potencial como agente de biocontrol.
3. Caracterizar el movimiento en superficie tipo "swarming" de *P. putida* KT2440.

En base a los resultados obtenidos en el análisis transcripcional, nos propusimos:

4. Estudiar el papel del segundo mensajero di-GMPc en la biología de KT2440 durante la colonización de la rizosfera.

III. RESULTADOS

Un análisis genómico de *Pseudomonas putida* en la rizosfera revela los aspectos clave para la supervivencia de la bacteria en este hábitat

Autores: Miguel A. Matilla, Manuel Espinosa-Urgel, José J. Rodríguez-Hervá, Juan L. Ramos y María Isabel Ramos-González.

Las bacterias pertenecientes al género *Pseudomonas* son colonizadores habituales de la raíz y del suelo circundante (rizosfera). En esta sección se llevó a cabo un análisis global de *P. putida* en la rizosfera de maíz mediante la utilización de la tecnología de microarrays que ha revelado que la población bacteriana ajusta su programa genético a este estilo de vida. Comparando las poblaciones en la rizosfera con tres controles distintos que cubrieron una variedad de nutrientes, fases de crecimiento y estilos de vida (planctónico y sésil), se identificaron 90 genes inducidos y ninguno reprimido. La existencia, entre ellos, de genes implicados en el transporte de aminoácidos y en el metabolismo de compuestos aromáticos refleja la particularidad de los nutrientes disponibles en los exudados. La inducción de bombas de eflujo y de enzimas para el metabolismo del glutatión indica que la adaptación a condiciones adversas y la respuesta de resistencia a estrés oxidativo pueden ser cruciales para la supervivencia de la bacteria en la rizosfera. El hallazgo de un regulador de respuesta GGDEF/EAL entre los genes inducidos sugiere un papel para el di-GMPc en colonización. Varios mutantes en genes *rup* presentaron menor eficiencia competitiva que la cepa silvestre como una indicación de que el análisis genómico permitió la identificación de nuevos determinantes de colonización.

Genome Biology
Vol 8, Nº 9, R179, Septiembre, 2007

Open Access

Research

Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere

Miguel A Matilla, Manuel Espinosa-Urgel, José J Rodríguez-Herva, Juan L Ramos and María Isabel Ramos-González

Address: Department of Environmental Protection, Estación Experimental de Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Profesor Albareda 1, Granada 18008, Spain.

Correspondence: María Isabel Ramos-González. Email: maribel.ramos@eez.csic.es

Published: 4 September 2007

Received: 7 March 2007

Genome **Biology** 2007, **8**:R179 (doi:10.1186/gb-2007-8-9-r179)

Revised: 9 July 2007

Accepted: 4 September 2007

The electronic version of this article is the complete one and can be found online at <http://genomebiology.com/2006/8/9/R179>

© 2007 Matilla et al.; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.**Abstract**

Background: Mutualistic interactions less well known than those between rhizobia and legumes are commonly found between plants and bacteria, frequently pseudomonads, which colonize roots and adjacent soil areas (the rhizosphere).

Results: A global analysis of *Pseudomonas putida* genes expressed during their interaction with maize roots revealed how a bacterial population adjusts its genetic program to this lifestyle. Differentially expressed genes were identified by comparing rhizosphere-colonizing populations with three distinct controls covering a variety of nutrients, growth phases and life styles (planktonic and sessile). Ninety rhizosphere up-regulated (*rup*) genes, which were induced relative to all three controls, were identified, whereas there was no repressed gene in common between the experiments. Genes involved in amino acid uptake and metabolism of aromatic compounds were preferentially expressed in the rhizosphere, which reflects the availability of particular nutrients in root exudates. The induction of efflux pumps and enzymes for glutathione metabolism indicates that adaptation to adverse conditions and stress (oxidative) response are crucial for bacterial life in this environment. The finding of a GGDEF/EAL domain response regulator among the induced genes suggests a role for the turnover of the secondary messenger c-diGMP in root colonization. Several mutants in *rup* genes showed reduced fitness in competitive root colonization.

Conclusion: Our results show the importance of two selective forces of different nature to colonize the rhizosphere: stress adaptation and availability of particular nutrients. We also identify new traits conferring bacterial survival in this niche and open a way to the characterization of specific signalling and regulatory processes governing the plant-*Pseudomonas* association.

Background

The surface of plant roots and the surrounding soil area constitute a complex environment, referred to as the rhizosphere, where microbial activity is high, sustained by the release of

nutrients through plant root exudates. This results in a bacterial population density that is one to two orders of magnitude higher than in bulk soil [1,2]. However, the diversity of bacterial species colonizing this habitat is significantly lower than

that found in other soil regions [3], suggesting that strong selective forces are at play in the rhizosphere. Part of this selective pressure is likely posed by the plant in the form of specific nutrients, secondary metabolites or signaling molecules in root exudates, and may constitute a means to promote mutualistic relationships with beneficial microorganisms. Although the best known example of such interactions is the endosymbiotic association of rhizobia with legume roots, other less studied instances of mutualism are commonly found between many plant species and rhizosphere-colonizing bacteria with plant growth promoting or disease suppressing activities [4,5]. Studying the gene expression program of a plant-beneficial bacterial population in the rhizosphere may shed light on the mechanisms underlying the establishment of mutualistic interactions between prokaryotic and eukaryotic organisms. It should allow us to explore in detail the determinants required by bacteria to adapt to and colonize this habitat, and provide a better understanding of sessile bacterial growth (that is, microcolony and biofilm formation) in association with biotic surfaces.

Previous efforts aimed at dissecting the genetic program of beneficial *Pseudomonas* in their association with plants have relied on *in vivo* expression technology. These studies provided useful yet limited information, since genome coverage was estimated to be 10-17% [6,7]. Nevertheless, *in vivo* expression technology can be effective to identify genes whose expression patterns would render them less apparent in microarray experiments, and provides a view at the single cell rather than the population level. Transcriptional profiling of *P. aeruginosa* after adding root exudates to laboratory growth medium has also been recently reported [8]. In our work we have performed a realistic approach, analyzing bacterial cells from the rhizosphere so that conditions characteristic of this situation, in particular the association of bacterial cells with the plant root surface and milieu and the continuous supply of exudates, are taken into account. Plants are not passive guests in this interaction, as can be deduced from the modifications observed in their gene expression patterns, not only locally in the root but also in the aerial parts. This systemic response was observed after infection of rhizobacteria-colonized *Arabidopsis* by phytopathogenic agents in comparison to non-colonized plants [9]. Overall, this work answers part of the increasingly recognized necessity of applying genomewide approaches to unveil microbial functioning in plant-bacterial interactions [10].

Results and discussion

Analysis of the *Pseudomonas putida* genetic program in the rhizosphere

To investigate how *Pseudomonas* populations readjust their genetic program upon establishment of a mutualistic interaction with plants, we have performed a genome-wide analysis of gene expression of the root-colonizing bacterium *Pseudomonas putida* KT2440 in the rhizosphere of corn (*Zea*

mays var. Girona), using microarrays (ArrayExpress repository for microarray data, accession number A-MEXP-949). Among other relevant characteristics, this strain is an excellent root colonizer of plants of interest in agriculture [7] and activates induced systemic resistance against certain plant pathogens (Matilla *et al.*, in preparation). Different experiments were designed in order to obtain as broad a picture as possible, comparing rhizosphere populations with three alternative controls: planktonic cells growing exponentially in rich medium (LB medium); planktonic cells in stationary phase in LB medium; and sessile populations established in sand microcosms (defined medium), under the same conditions used to grow inoculated corn plants (see Materials and methods). The combination of these diverse growth conditions balances the contribution of parameters such as growth phase, nutrients and life style to any observed changes in gene expression. Unveiling differentially expressed genes common to all the studies would minimize noise and allow us to identify genes with a reliable and specific change in their expression level in the rhizosphere, likely to be important for survival in this environment. RNA samples were obtained from bacterial cells recovered from the rhizosphere six days after inoculation of gnotobiotic seedlings, and from each of the control settings. Microarrays were hybridized with equal amounts of differentially labeled cDNA and examined for up- and down-regulated genes. Data were processed in two separate ways. The first consisted of evaluating every single experiment (consisting of three biological replicas each) independently, followed by the imposition that genes showing significant changes in gene expression did so in the three experiments, each with a different control. The second analysis evaluated these three experiments through a combined examination of the nine microarrays altogether, followed by a *P* value adjustment. Finally, the results from both data treatments were compared.

Two general observations can be highlighted when rhizospheric KT2440 bacteria are compared to their control counterpart by analyzing each experiment individually. The first is that gene activation is more conspicuous than gene repression in the bacterial rhizospheric life style, as reflected by the fact that over 50 genes were induced more than 6-fold in the three experiments (Figure 1). In total, 90 genes appeared consistently up-regulated in the rhizosphere versus all three controls (fold change >2, *P* value < 0.05), and none down-regulated (fold change <-2, *P* value < 0.05) (Figure 2; Additional data file 1). A selection of up-regulated genes is listed in Table 1. The second relevant result was that sessile *P. putida* growing in sand microcosms and stationary phase cells exhibited the most comparable and the most dissimilar gene expression pattern, respectively, with respect to rhizosphere cells (Figure 1). It is worth noting that many genes encoding ribosomal proteins are induced in the rhizosphere after six days of colonization compared to stationary phase (Additional data file 1), indicating the existence of active growth and metabolism, at least in a subpopulation of cells.

These results offer a view of *P. putida* life in association with plant roots as a situation where metabolically active bacterial cells grow in a biofilm-resembling state [11], although with their genetic program adjusted to the presence of the plant.

The combined analysis of the three experiments as a group (nine microarrays) identified a larger number of genes induced and repressed in rhizospheric cells than when the independent analysis, followed by clustering, was done as described above. This was an expected statistical consequence of the increased number of tests in the analysis. Table 2 shows the numbers before and after applying corrections of the *P* value. Even with the strictest procedure, the Bonferroni correction [12], which is scarcely used in microarray studies due to its stringency, 57 genes appeared as up-regulated in *P. putida* in the rhizosphere. Of these, 54 were part of the group of 90 mentioned above as a result of the independent analysis (Figure 2). No repressed gene passed the cutoff with the Bonferroni method (Additional data file 2). The remaining 36 up-regulated genes identified with the independent analysis were part of the group of over 300 obtained after applying a less strict correction [13] to the combined analysis (Figure 2; Additional data file 3). With this method, a substantial number of genes appear as rhizosphere-repressed, although the majority show fold changes close to the -2 cutoff (Additional data file 3).

Real time RT-PCR confirmation of changes in the mRNA levels of rhizosphere differentially expressed genes

To validate our microarray data by an independent technology, gene expression of six genes among those identified as rhizosphere up-regulated was examined in the rhizosphere versus microcosm by real time RT-PCR. Other neighbor genes not identified in the microarrays as rhizosphere induced were also included in the RT-PCR analysis, that is, PP1477 and PP4988, which likely form part of same transcriptional units as PP1476 and PP4987 (Table 1), respectively, and PP3744, the *glc* transcriptional activator of the rhizosphere induced gene encoding PP3746 (Table 1). All these genes were differentially expressed with a fold change higher than three (Table 3), confirming the microarray results, and indicating that if genes are listed in Table 1 it does not necessarily mean they were not induced in the rhizosphere. Restrictive conditions imposed to pass the cutoff might be the cause of this underestimation. Gene expression variability within the same operon may also occur, due to factors such as different mRNA stability or the existence of internal promoters.

Reliable rhizosphere up-regulated (*rup*) genes

Following the initial premise of identifying genes with a reliable and specific change in their expression levels, we focused our attention primarily on the 93 genes showing increased expression in the rhizosphere (90 obtained from the independent analysis and the additional 3 that passed the Bonfer-

roni adjustment of the combined analysis; Table 1) with respect to any other condition. About one-third of these encode hypothetical proteins whose specific functions have yet to be determined (Additional data file 1).

The remaining genes with increased expression in the rhizosphere provide an ample view of the determinants at play in this plant-bacterial interaction (Table 1), some confirming previous data about the participation of elements such as flagella or thiamine (vitamin B1) biosynthesis. One conclusion to be drawn is that aside from interspecific competition, which is not contemplated in these experiments, two opposing forces act simultaneously, driving bacterial adaptation to life in the rhizosphere. On one hand, nutrient availability is reflected by the increased expression of genes involved in the uptake of certain carbon and nitrogen sources (in particular amino acids, dipeptides and polyamines), some of them, like glycolate, excreted by plants, as well as metabolic and degradative functions (degradation of aromatic compounds such as phenylacetic and/or phenylalkanoic acids, sarcosine oxidase, plant exopolymers β -glucosidase, urease). The high induction of an urease accessory protein may be related to the limiting nitrogen source, since the nitrogen is likely being used by the plant. Alternatively, compounds other than urea in the root exudates of corn plants might be responsible for this induction, since urea is not produced by this plant [14]. On the other hand, genes coding for stress response and detoxification proteins also show increased expression in the rhizosphere. These include glutathione peroxidase, a protein of the Pmp3 family, or the fatty acid *cis-trans* isomerase Cti, which has been related to stress adaptive mechanisms, in particular to membrane-toxic organic compounds [15,16], as well as several putative efflux transporters of toxic compounds. This indicates the necessity to cope with oxidative stress and other damaging agents, for instance, secondary metabolites present in seed and root exudates that show antimicrobial activities [17,18]. In this context it has been shown that the TtgABC efflux pump of *P. putida* recognizes a wide set of flavonoids [19]. However, these results should also be interpreted from a second perspective, and not just as defense mechanisms required by rhizosphere colonizers in order to benefit from the nutrients released by the plant. Reactive oxygen species produced in root tissues have been implicated not only in stress but also in signaling processes in legume-rhizobia symbioses [20]. Such a potential role has recently started to be investigated in other mutualistic associations [21].

Plant-bacterial signaling may be reflected by another relevant group of genes induced in the rhizosphere, comprising signal transduction sensors and response regulators, as well as three transcriptional regulators of the AraC and TetR families. In this group is included the sensor histidine kinase PhoR, which participates in the global response to inorganic phosphate limitation. Autophosphorylation of *phoR* in *Bacillus* has been reported to be modulated by the redox state, so that

Table 1

Rhizosphere up-regulated (*rup*) genes

Locus - TIGR annotation	Fold change			
	Log*	St.†	Sand‡	Combined§
Cytochrome biosynthesis				
PP0109 - membrane protein putative	<i>P</i> > 0.05	10.3	7.9	7.7
PP0110 - <i>cyoE-1</i> -protoheme IX farnesyltransferase	13.2	51.5	10.2	-
PP3183 - SCO1/SenC family protein/cytochrome c	2.9	5	3	-
Metabolism				
PP0326 - <i>soxG</i> -sarcosine oxidase gamma subunit	4.8	7.9	5.8	6
PP1403 - <i>bglX</i> -periplasmic beta-glucosidase	2.5	2.9	2.5	2.6
PP2694 - aldehyde dehydrogenase family protein	9	8.3	LS	10.2
PP2847 - <i>ureJ</i> -urease accessory protein UreJ	22.9	29.6	21.9	24.6
PP3281 - phenylacetic acid degradation protein Paal putative	6.2	8.1	8.6	7.5
PP3352 - arylsulfatase putative	36.5	17.6	49.4	31.5
PP3746 - <i>glcE</i> -glycolate oxidase subunit GlcE	3.6	3.4	3.6	3.5
PP3923 - phosphoglycerate mutase family protein	4.5	4.3	2.8	3.8
PP4588 - nitroreductase family protein	2.6	2.3	3.3	2.7
PP4782 - <i>thiD</i> -phosphomethylpyrimidine kinase	8.5	5.8	5.5	6.5
PP5076 - <i>gluB</i> -glutamate synthase large subunit	3.4	5.5	2.1	-
PP5197 - <i>ubiF-2</i> -octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1,4-benzoquinol hydroxylase	6.9	3.5	5.8	5.2
Secondary metabolism				
PP3786 - aminotransferase	5.3	4.3	2.1	-
Chemotaxis and motility				
PP4331 - conserved hypothetical protein	4.9	5.6	4.5	5
PP4359 - <i>flhL</i> -flagellar protein FliL	4	4.6	2.8	3.7
PP4391 - <i>flgB</i> -flagellar basal-body rod protein FlgB	3	5.2	5.2	4.3
PP4987 - chemotaxis protein putative	6.4	7.3	4.4	5.9
Regulators and sensor proteins				
PP1066 - sigma-54 dependent response regulator	13	41.9	10.1	17.6
PP3640 - transcriptional regulator AraC family	19.7	28.9	10.3	-
PP4295 - transcriptional regulator TetR family	8.9	8.7	6	7.7
PP4508 - transcriptional regulator AraC family	3.2	2.7	3.2	3
PP0700 - transmembrane sensor putative	21.9	50.4	26.2	30.7
PP2127 - sensor histidine kinase	31.8	14.1	17.3	19.8
PP4959 - sensory box protein/response regulator	14.7	5.1	9.4	8.9
PP5321 - <i>phoR</i> -sensory box histidine kinase PhoR	10.5	9.1	9.7	9.8

Table 1 (Continued)

Rhizosphere up-regulated (*rup*) genes

Stress adaptation and detoxification

PP0373 - Pmp3 family protein	8.1	8.4	8	8.1
PP1874 - glutathione peroxidase (GSH_peroxidase)	4.3	7.9	5.4	5.7
PP2376 - <i>cti</i> -esterified fatty acid <i>cis/trans</i> isomerase	2.4	3.6	2.3	-
PP3535 - <i>ggt-1</i> -gamma-glutamyltransferase	2.2	2.2	2.1	2.2

ABC transporters

PP0196 - ABC transporter ATP-binding protein putative	2.4	6.7	3.7	-
PP2669 - outer membrane protein putative	9.5	11.6	4.7	8
PP3210 - ABC transporter permease protein	3.4	4.3	3.9	3.8
PP3223 - ABC transporter periplasmic binding protein (dipeptide)	36.9	25.4	66.4	39.5
PP3802 - cation ABC transporter ATP-binding protein putative	13.8	20.1	5.2	-
PP4305 - periplasmic thiosulfate-binding protein	3.2	3.8	2.7	3.2
PP4483 - basic amino acid ABC transporter ATP-binding protein	3.5	4.6	2.6	3.5

Efflux pumps

PP0670 - transporter bile acid/Na ⁺ symporter family	5.7	11.1	3.7	-
PP0906 - multidrug efflux RND transporter putative	3.5	8.5	2.6	-
PP1271 - multidrug efflux MFS transporter putative	11.3	25.6	18.1	17.4
PP2817 - <i>mexC</i> -multidrug efflux RND membrane fusion protein MexC	3.8	6	2.2	-
PP3583 - RND efflux transporter permease protein	2.7	4.2	3	-

Other transporters

PP2385 - <i>azlC</i> -branched-chain amino acid transport protein AzlC	4	4.1	3.2	3.8
PP3132 - polysaccharide transporter putative	3.1	3.9	2.6	3.2
PP5297 - amino acid transporter putative (polyamines)	6.6	8.8	6.7	7.3

DNA replication, recombination and repair

PP1476 - conserved hypothetical protein	17.3	76.2	29	33.7
PP2565 - helicase putative	5.5	12.6	5.1	-
PP3966 - ISPpu14 transposase Orf1	17.3	11.4	8.1	11.7

Others

PP2076 - hypothetical protein	4.4	<i>P</i> > 0.05	7.5	5.2
PP2155 - <i>lalD</i> -lipoprotein releasing system ATP-binding protein	4	2.4	5.2	-
PP2560 - transport protein HasD putative	23.3	60	9	-
PP3184 - hypothetical protein	6.6	3.9	3.9	4.6

Proteins with predicted general function and hypothetical proteins not mentioned in the text are not included (Additional data file 1). Although the *P. putida* KT2440 genome is sequenced and annotated [49], the locus functions listed in this table were one by one re-confirmed by comparing the amino acid sequences with those in the databases. The complete list of *rup* genes (genes with fold induction >2, *P* value < 0.05, and average signal-to noise A >64) is available in Additional data files 1-3. *Control with LB log cells; †control with LB stationary phase cells; and ‡control with sessile cells from microcosm without plant. §Genes passing the Bonferroni cutoff after a combined analysis of the nine microarrays altogether. A dash is used to mark those *rup* genes not passing the Bonferroni cutoff, although they did pass the Benjamini and Hochberg adjustment. LS, low signal (below cutoff).

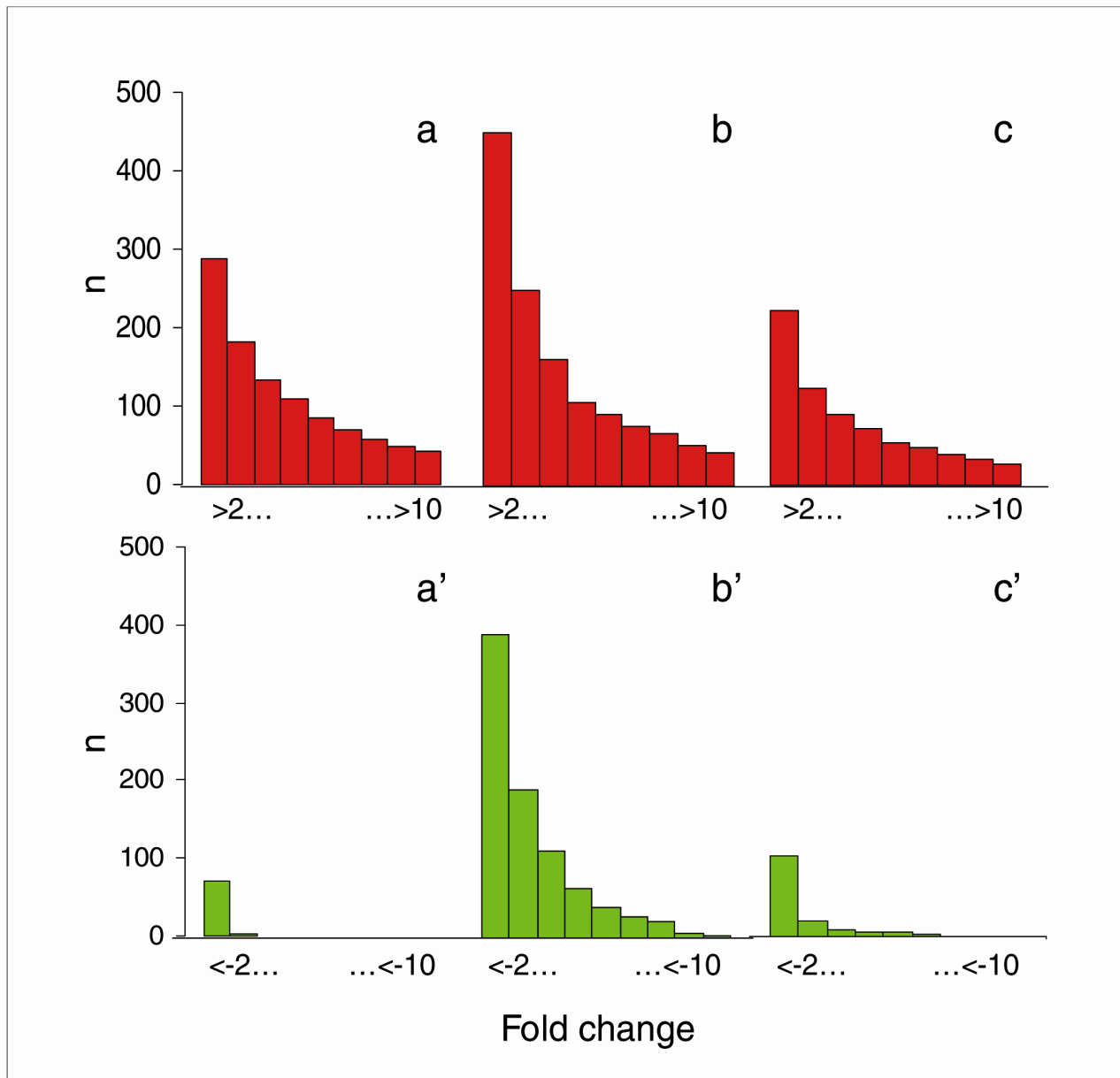


Figure 1
 Microarray profiling of bacterial gene expression in the rhizosphere. (a-c) Global gene expression of *P. putida* KT2440 was analyzed in the rhizosphere versus that of LB log bacteria ($OD_{660} = 0.7$) (a, a'), LB stationary phase cells ($OD_{660} = 3.3$) (b, b'), and sessile bacterial cells incubated in sand microcosms (c, c'). Experimental set up and cDNA preparation are described in detail in Materials and methods. Genes induced (red) and repressed (green), with a *P* value < 0.05 and *A* > 64 were clustered according to their fold change (>2 to >10) and (≤ 2 to ≤ 10) and the number is plotted.

terminal oxidases are required for the Pho system's full induction [22]. Interestingly, two genes predicted to be involved in aa_3 -type cytochrome c oxidase assembly (PP0109 and PP0110) are induced in the rhizosphere. In other microorganisms, the Pho regulon has been implicated, among other processes, in biofilm formation and includes genes for the synthesis of antibiotics and other secondary metabolites [23-25]. The importance of secondary metabolism in mutualistic plant-*Pseudomonas* interactions is being studied from

the point of view of the plant [17] and of the microorganism [26]. In our study, PP3786, predicted to participate in the synthesis of an as yet undefined secondary metabolite, was induced in the rhizosphere.

Finally, it is worth noting the expression of genes pointing towards potential DNA transfer and rearrangements that may take place in the rhizosphere. These include a helicase and the insertion sequence *ISPpu14* transposase, of which the six cop-

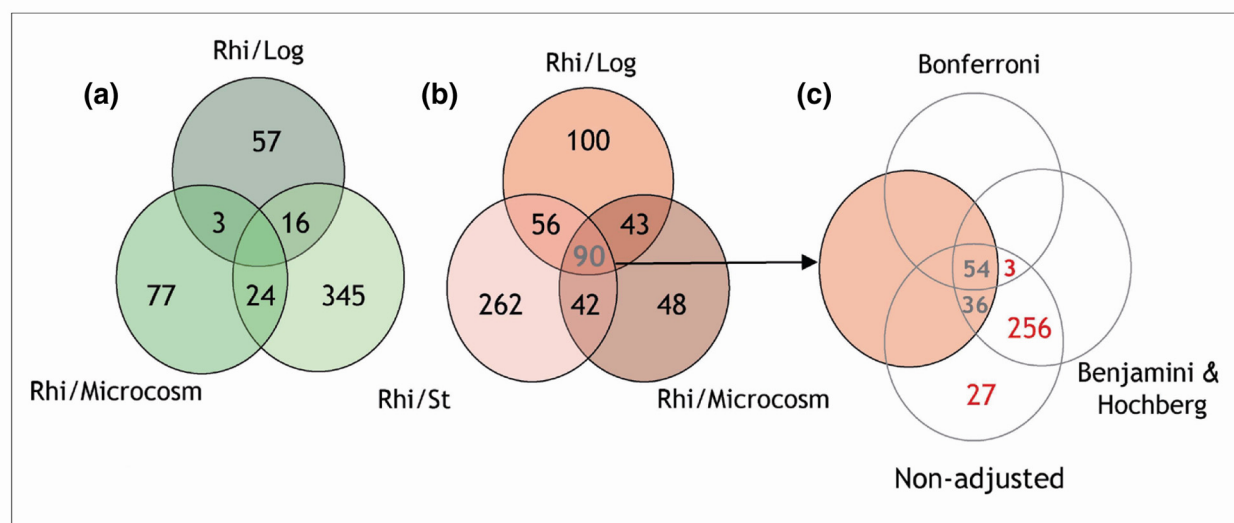


Figure 2
 Venn diagrams showing the overlap between differentially expressed genes in the rhizosphere. (a) Down-regulated and (b) up-regulated genes resulting from the individual analysis of each experiment: rhizosphere versus LB exponentially growing cells (Rhi/Log), rhizosphere versus LB stationary phase cells (Rhi/St), and rhizosphere versus sessile cells in microcosm without plant (Rhi/Microcosm). Common genes were clustered automatically with a freely available informatics tool [48]. (c) The result of the combined analysis of the three experiments before and after applying adjustments in the P value. Out of the 57 Bonferroni genes, 54 are included in the 90 overlapping *rup* genes.

ies present in the genome of KT2440 were induced in the rhizosphere (five at a significant level; Additional data file 3).

Role of rhizosphere up-regulated genes in colonization fitness

To give an ecological significance to our results, we analyzed the role of several *rup* genes in competitive colonization and found that mutants in some *rup* genes are hampered in their survival in the rhizosphere in competition with the wild type, while they are indistinguishable from it under laboratory conditions. Nine transposon insertion mutants were chosen to test the relevance of rhizosphere expressed genes for the establishment of the *Zea mays*-*P. putida* association and microbial fitness in the rhizosphere. The mutants were selected to represent various classes of physiological roles (respiratory chain, transport, metabolism, stress adaptation, motility, transcriptional regulation and also hypothetical proteins). In some cases where the rhizosphere-induced gene is part of an operon, available mutants in genes included in the

transcriptional unit were used. Competitive rhizosphere colonization assays were performed, and the proportion of each strain in the rhizosphere population was assessed after 12 days (Figure 3). In five cases, the wild type had displaced the mutant to a significant extent, so that the later represented less than 30% of the total population, supporting the idea that genes differentially expressed in the rhizosphere versus all the controls are important for bacterial fitness in this environment. The identification of KT2440 genetic determinants with a specific role in rhizosphere fitness constitutes a relevant result, since previously identified mutants of this strain hampered in colonization were also affected in growth under laboratory conditions [27] (our unpublished results). Most of the mutants identified here are also hampered in root colonization of the model plant *A. thaliana* (our unpublished results). Two of these mutants, PP0110 and PP1477, are also affected in adhesion to corn seeds (data not shown), indicating that their role is directly related to life on plant surfaces.

Table 2

Number of differentially expressed genes in the rhizosphere		
	Induced	Repressed
Non-adjusted P value	376	119
Benjamini and Hochberg	349	85
Bonferroni correction	57	-

Result of the combined analysis of nine microarrays, three biological replicates per experiment and three experiments (each with a different control). See the text for details. Dash indicates no gene passed the cutoff.

comment
 reviews
 reports
 deposited research
 refereed research
 interactions
 information

Table 3

Differential gene expression of *rup* genes (real time RT-PCR)

Gene	Fold change ^a
PP1476 - conserved hypothetical protein	5.07 ± 0.4
PP1477 - <i>recJ</i> -single-stranded-DNA-specific exonuclease RecJ	5.48 ± 0.7
PP2076 - hypothetical protein	7.13 ± 0.4
PP2560 - transport protein HasD putative	3.84 ± 0.3
PP3744 - <i>glc</i> operon transcriptional activator	3.80 ± 0.2
PP3746 - glycolate oxidase, subunit GlcE	21.30 ± 1.5
PP4987 - chemotaxis protein putative	6.51 ± 0.9
PP4988 - chemotaxis protein putative	5.02 ± 0.8
PP5321 - <i>phoR</i> -sensory box histidine kinase PhoR	4.58 ± 0.1

^aRhizosphere versus microcosm. Average of three samples and standard deviation are shown.

The open reading frame encoding PP1477 is located 9 bp downstream to the *rup* gene encoding PP1476, so that polar mutations in PP1476 likely affect the expression of PP1477. The most noticeable result was obtained with mutant PP0906, which is affected in a putative multidrug efflux transporter, in agreement with the notion that the ability to cope with toxic compounds is one of the key traits for survival in the rhizosphere. However, this mutant was hampered in growth under laboratory conditions and was not further considered. Mutant PP3279 is affected in aromatic compound metabolism, specifically in CoA activation of phenylacetic acid [28], perhaps its reduced fitness being a consequence of its inability to remove toxic compounds from the exudates. Another mutant in the phenylacetyl-CoA pathway, PP3283, which forms part of the same functional unit as the *rup* gene encoding PP3281 [28], was also affected in competitive colonization (not shown). The fifth mutant is affected in a type I secretion system of an exported protein with animal peroxidase and calcium binding domains. Two other mutants also showed reduced competitive colonization capacity, although to a lesser extent. These genes are nevertheless interesting. PP4959 codes for a response regulator containing a signal receiving domain and GGDEF/EAL domains, which have been implicated in regulating the transition from planktonic to sessile life styles through secondary messenger c-di-GMP levels [29]. Mutant PP4988 is affected in a sensor histidine kinase that forms part of a chemotaxis signal transduction operon (comprising loci PP4990 to PP4987), which in *P. aeruginosa* controls twitching motility mediated by type IV pili [30]. A role for type IV pili in biofilm formation as well as in attachment to legume roots has been reported [31,32], but this is the first indication that signal(s) present or absent in the root environment may trigger type IV pili functionality.

Transcriptional profiling *in vitro* [8] serves to pinpoint relevant components of exudates and how these influence bacterial physiology, but it obviates some of the conditions characteristic of the actual situation in the rhizosphere, in particular the association between bacterial cells and the

plant root surface. A comparison of the data obtained here with that work shows limited overlap. Six genes identified in *P. aeruginosa* with increased expression in the presence of sugar beet exudates are homologs of *P. putida* genes induced in the corn rhizosphere, such as the helicase PP2565, or functionally related to them, like *soxB* (encoding sarcosine oxidase β-subunit). These are likely to reflect common characteristics of the root exudates of both plant species and/or compounds causing equivalent responses. With respect to genes previously identified in *P. putida* by *in vivo* expression technology, it is worth mentioning the PP1476/PP1477 operon, which as described above, is required for efficient colonization of seeds and roots. PP1476 encodes a homolog to *E. coli* YaeQ, which compensates for the loss of RfaH [33], a specialized transcription elongation protein. PP1477 corresponds to RecJ, an exonuclease involved in recombination and DNA repair after UV [34] or oxidative damage [35], again supporting the view of the rhizosphere as an environment where nutrient availability comes at an extensive cost in terms of the battery of protection mechanisms that have to be kept active. This work opens a challenging perspective to the study of mutualistic plant-microbe associations where, besides other determinants, energetic balances should be taken into account as part of the factors that define the success of these cross-kingdom interactions.

Conclusion

The current study constitutes, to our knowledge, the first report on bacterial genomics in the rhizosphere. The main functions identified in this transcriptional profiling study as being specifically expressed in the rhizosphere are integrated in the scheme shown in Figure 4. Future work should aim at unveiling the regulatory mechanisms that control such reprogramming of transport, metabolic and stress-related functions. We have also demonstrated that RNA samples of good quality and in enough quantity can be obtained from a bacterial population growing in this complex environment so that parameters of great interest in the plant-*Pseudomonas* inter-

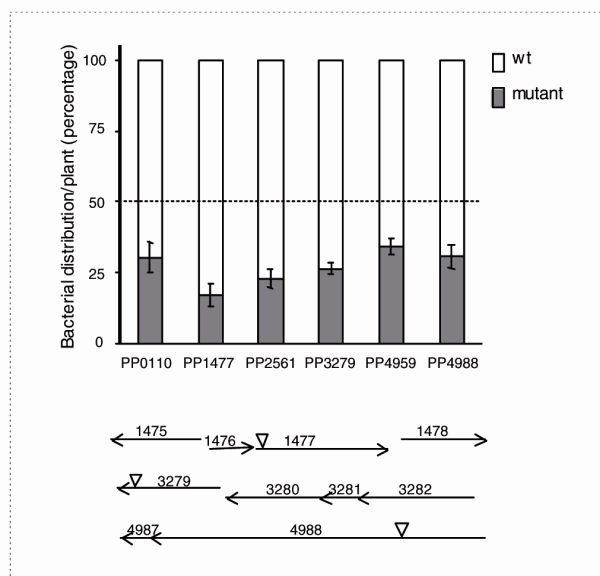


Figure 3

Rhizosphere fitness of mutant strains in competition with KT2440RTn7-Sm. The knocked-out open reading frame in the mutant strains is indicated by the locus name. Proportion of mutant (grey) and wild type (white), which was $50\% \pm 2\%$ in the initial inocula, is plotted after 12 days of colonization. Data are the averages and standard error for six plants. KT2440RTn7-Sm, a streptomycin resistant derivative of KT2440R (see Materials and methods), was used as the wild-type strain in the experiments. KT2440RTn7-Sm and KT2440R are equally competitive in root colonization (not shown). Sm resistance marker of the wild-type bacteria allowed their specific selection against the mutants, which were kanamycin resistant derivatives of KT2440R. Statistical analysis was carried out using SPSS software (version 12.0.1 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The linear model univariate analysis of variance rendered significant differences for the mutants shown in the figure (P value < 0.05) in comparison with the wild type. Seed adhesion rate was similar for mutants and KT2440R (0.5%), with the exception of PP0110 and PP1477 (0.1%). The growth of the mutants under laboratory conditions (rich and defined medium) was indistinguishable from that of KT2440RTn7-Sm. The transcriptional organization of mutated genes is shown in the bottom. The space between the 3' end of PP1476 and the 5' end of PP1477 is 7 bp. Translational coupling between PP3281 and PP3280 (8 bp) was observed. PP3279 is probably in an independent operon; however, PP3279 and PP3281 code for enzymes in the same degradative pathway [28]. Translational coupling between PP4987 and PP4988 was also observed (8 bp). Arrows indicate direction of transcription. Transposon insertion is indicated by inverted triangles.

action, such as the physical contact between the root and the bacteria and also the constant supply of root exudates, can be considered in gene expression studies. This work opens a challenging perspective to the study of mutualistic plant-microbe associations where, besides other determinants, energetic balances between nutrient availability and stress resistance should be considered to explain the success of these interkingdom relationships.

Materials and methods

Bacterial strains, culture conditions, and solutions

P. putida KT2440 is a derivative of *P. putida* mt-2, which was isolated from a vegetable-planted field [36]. The genome of KT2440 is completely sequenced [37]. Rifampin-resistant derivative KT2440R was generated elsewhere [38]. All the mutants used in competitive root colonization assays are derivatives of KT2440R and exhibit kanamycin resistance from the miniTn5 transposon insertion that causes the mutation. The transposon insertion site was determined by using arbitrary PCR at the *Pseudomonas* Reference Culture Collection [39] and is available upon request. KT2440RTn7-Sm was generated by site specific insertion of miniTn7- Ω Sm1 at an extragenic site near *glnS* [40] in KT2440R. *P. putida* strains were routinely grown at 30°C in LB medium, except for microarray experiments, in which bacteria were cultivated at 24°C and 200 rpm. When appropriate, antibiotics were added to the media at the following concentrations (μ g/ml): kanamycin, 25; streptomycin, 100; rifampin, 10.

P. putida microarrays

The technical description of the *P. putida* genome array is available at the ArrayExpress repository for microarray data (accession number A-MEXP-949). This genome-wide DNA chip has been used elsewhere [41-43].

Experimental set-up for preparation of the control samples for microarray experiments

Controls in microarray experiments consisted of: LB log phase cells ($OD_{660\text{ nm}} = 0.7$); LB stationary phase cells ($OD_{660\text{ nm}} = 3.3$); and early stationary phase bacteria from sand microcosms. Microcosms consisted of 50 ml Sterilin tubes containing 40 g of sterile water-washed silica sand. About 10^5 CFU was incubated at 24°C for 18 h and bacterial growth was supported with 4 ml of plant nutrient solution [7] supplemented with sodium citrate 15 mM, Fe-EDTA 100 μ M, and micronutrients of Murashige and Skoog medium (MS) [44]. To recover cells from the microcosms, they were shaken at 400 rpm for 2 minutes with 80 ml M8 salts [45] and left standing for 15 s. All cells from bacterial suspensions were collected by centrifugation at 4°C (6,700 \times g, 8 minutes) in tubes precooled in liquid nitrogen. Pellets were immediately frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C.

Surface sterilization, germination of seeds and root colonization assay

Corn seeds were surface-sterilized by rinsing with sterile deionized water, washing for 10 minutes with 70% (vol/vol) ethanol, then for 15 minutes with 20% (vol/vol) bleach, and followed by thorough rinsing with sterile deionized water. Surface sterilized seeds were pregerminated on MS medium [44] containing 0.2% (wt/vol) phytigel (Sigma P8169, St. Louis, MO, USA) and 0.5% (wt/vol) glucose, which was used instead of sucrose to monitor any contamination of the seeds, at 30°C in the dark for 48 h. For root colonization assays, seeds were inoculated with approximately 5×10^6 CFU/ml

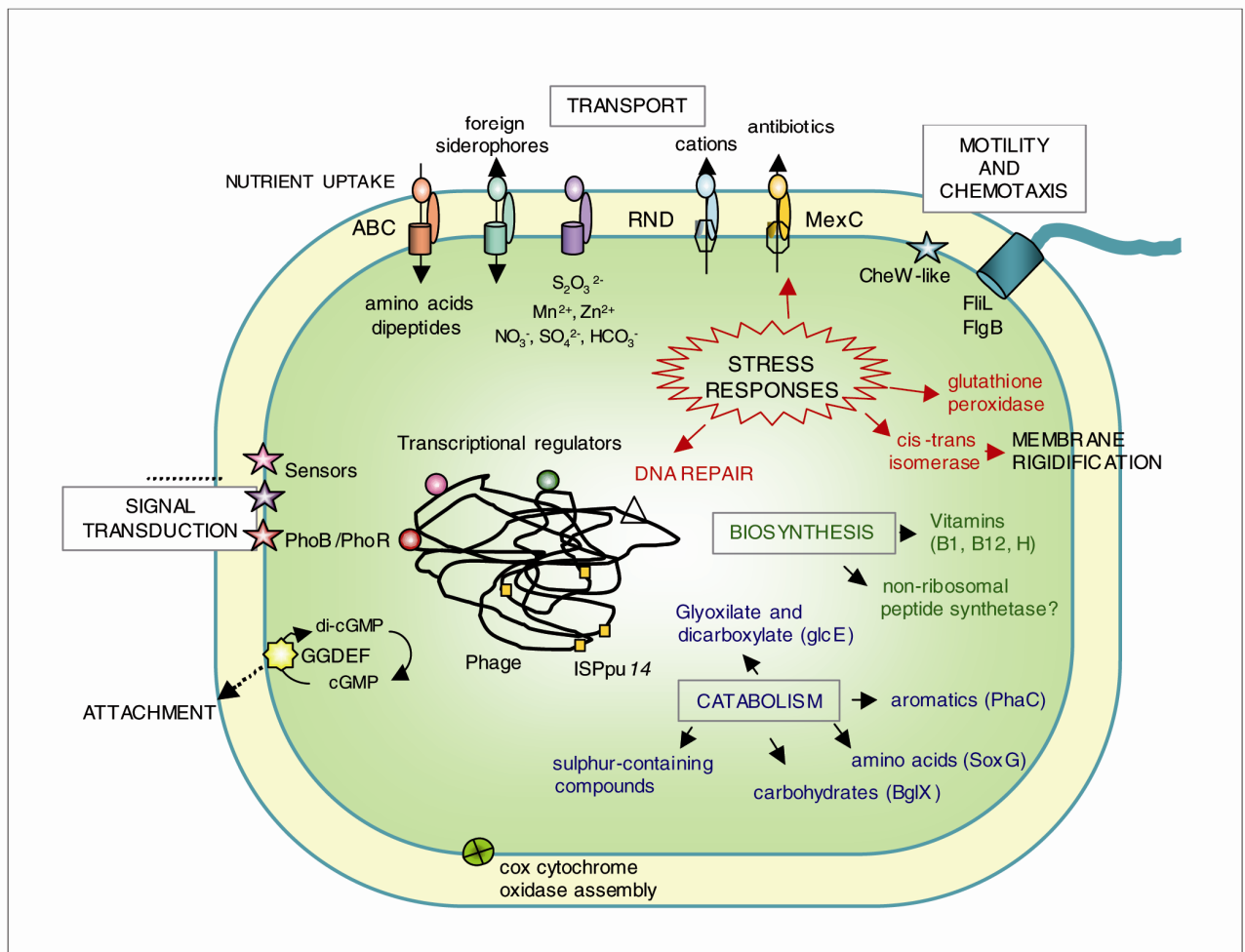


Figure 4
Integrated scheme showing relevant bacterial functions induced in the rhizosphere-*Pseudomonas* interaction. Functions related to genes included in Additional data file 3 have also been included in this figure. See text for details.

from LB medium overnight culture suspended in M9 salt [45]. After incubation without shaking for 30 minutes at 30°C, seeds were washed and planted in 50 ml Sterilin tubes containing 40 g of sterile washed silica sand and 10% (vol/wt) plant nutrient solution supplemented with Fe-EDTA and MS micronutrients as described above, being the final inoculum size of 10⁵ CFU. Inoculated plants were maintained in a controlled chamber at 24°C and 55-65% humidity with a daily light period of 16 h. After 6 days, plants were collected, shoots discarded and the roots placed in 50 ml Sterilin tubes containing 15 ml of M8 salts [45] and 4 g of glass beads (3 mm diameter). Tubes were vortexed for 2 minutes, left standing for 15 s and cells from bacterial suspensions collected by centrifugation for 8 minutes at 6,700 × g (4°C) in tubes precooled in liquid nitrogen. Pellets were immediately frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C.

Competitive root colonization assays

Surface sterilization, germination of seeds, and bacterial inoculation were performed as described in the previous section, except seedlings were inoculated with a mix of KT2440RTn7-Sm, as the wild type, and the mutant strain in the specified *rup* gene. Inocula size differences between wild-type and mutant strains were less than 2%. At the indicated times, bacterial cells were recovered from the rhizosphere as specified above. LB-agar supplied with rifampin and streptomycin (or kanamycin) was used to select KT2440RTn7-Sm or the mutant strains, respectively.

RNA purification and preparation of labeled cDNA

Total RNA from the bacteria recovered from the rhizosphere of six plants and from the control samples was extracted by using TRI Reagent (Ambion, ref. 9738, Austin, TX, USA) as recommended by the manufacturer except that Tripure Isolation reagent was preheated at 70°C followed by purification

with RNeasy columns (Qiagen, cat no. 74104, Hilden, Germany). RNA concentration was determined spectrophotometrically and its integrity was assessed by agarose gel electrophoresis. RNA (30 µg) was primed with 30 µg of pd(N)₆ random hexamers (Amersham, cat. no. 27-2166-01, Piscataway, NJ, USA). Indirect cDNA labeling was used to generate fluorescent probes for hybridization. cDNA synthesis was performed at 42°C for 2 h in a 30 µl reaction volume containing 0.5 mM (each) dATP, dCTP, and dGTP; 0.25 mM (each) dTTP and aminoallyl-dUTP (aa-dUTP; Sigma cat. no. A0410); 10 mM DTT; 40 U of RNaseOUT (Invitrogen, ref. 10777-019, Carlsbad, CA, USA); and 400 U of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, ref. 18064-014) in reverse transcriptase reaction buffer. The reaction was stopped by adding 10 µl of 50 mM EDTA and the RNA template was hydrolyzed with the addition of 10 µl of 1 N NaOH followed by incubation at 65°C for 15 minutes. Samples were then neutralized by adding 25 µl of 1 M HEPES (pH 7.5) and the hydrolyzed RNA and residual dNTPs were removed using QIAquick PCR purification columns (Qiagen, ref. 28104) according to the manufacturer's recommendations, except that the Tris-based elution buffer supplied with the kit was replaced with phosphate elution buffer (4 mM KPO₄ pH 8.5) to avoid interferences with the subsequent labeling. cDNA samples were dried in a Speed-Vac to completion. Dried aminoallyl-labeled cDNA was resuspended in 9 µl of 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.0), mixed with either Cy3 (control) or Cy5 (rhizospheric samples) fluorescent dyes (mono-reactive NHS-esters; Amersham Biosciences, cat. no. PA23001 and PA25001, respectively), and allowed to couple for 2 h at room temperature in the dark. After coupling, the reaction was quenched with 4.5 µl of 4 M hydroxylamine for 15 minutes. Finally, labeled cDNA probes were again purified with QIAquick PCR purification columns. Labeling efficiency was assessed using a NanoDrop ND1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA).

Microarray hybridization and data analysis

Prior to the hybridization process, the microarray slides were blocked by immersion into 5× SSC (1× SSC is 0.15 M NaCl; 15 mM sodium citrate, pH 7), 0.1% (wt/vol) SDS, 1% (wt/vol) bovine serum albumin for 1 h at 42°C. Then, the slides were washed by two successive immersions in MilliQ water at room temperature, followed by a final wash with isopropanol. The slides were spin-dried by centrifugation at 1,500 × g for 5 minutes, and used within the next hour. Equal amounts of Cy3- and Cy5-labeled cDNAs, one of them corresponding to the control and the other one to the problem to be analyzed, were mixed, dried in a Speed-Vac and reconstituted in 35 µl of hybridization buffer (5× SSC, 25% (vol/vol) formamide, 0.5% (wt/vol) SDS, 5× Denhardt's solution, 5% (wt/vol) dextran sulfate) preheated to 42°C. The labeled probe was denatured at 98°C for 3 minutes, applied onto the microarray slide and covered with a glass coverslip. The slide was then introduced in a humidified hybridization chamber (AHC ArrayIt Hybridization Cassette; Telechem International, Inc., Sunny-

vale, CA, USA) and incubated for 18-20 h in a water bath at 42°C, preserved from light. Following hybridization, the microarrays were washed by gentle agitation in 2× SSC, 0.1% (wt/vol) SDS at 42°C for 5 minutes, followed by a 5 minute wash at room temperature in 1× SSC, two 5 minute washes in 0.2× SSC, and a final 5 minute wash in 0.1× SSC. Finally, the slides were spin-dried in a centrifuge at 1,500 × g for 5 minutes, and scanned on a GenePix 4100A scanner (Axon Instruments, Inc., Foster City, CA, USA). Images were acquired at 10 µm resolution, and the background-subtracted median spot intensities were determined using GenePix Pro 5.1 image analysis software (Axon Instruments, Inc.). Spots with anomalies were discarded and excluded from further analysis. Spot signal intensities were normalized by applying the Lowess intensity-dependent normalization method [46], and statistically analyzed using the Almazan System software (Alma Bioinformatics SL, Madrid, Spain). Three independent biological replicates were performed for each experiment. *P* values were calculated by Student's *t*-test. A particular open reading frame was considered differentially expressed if: the fold change was at least 2; the *P* value was lower than 0.05; and the average signal-to noise (A) was at least 64. In the combined analysis of the nine microarrays, *P* values were adjusted for multiple testing to control the false discovery rate [13] or the type I family wise error rate by applying the Bonferroni correction [12]. Microarray data have been deposited in the ArrayExpress database (E-MEXP-949).

Real time RT-PCR

Total RNA (1 µg) treated with *Turbo DNA free* (Ambion, ref 1907) was retrotranscribed to cDNA with Superscript II reverse transcriptase using random hexamers as primers. The specific primer pairs used to amplify cDNA were: 5'-CAGAC-TATCGCTCGGCAC and 5'-CGGCTCATCGACATCCGAC for the gene encoding PP1476; 5'-CGATCACCGCGCATCACTT and 5'-GTCTCGCACAGCAGGCATT for the gene encoding PP1477; 5'-CGCTTCATCCAGCCTTCC and 5'-CGAGAC-GATCTGGTCTGTTG for the gene encoding PP2076; 5'-GGCCGACGTGCTGTTTCACT and 5'-AGCATGCCTAAGGT-GGTGAC for the gene encoding PP2560; 5'-CATCATC-GACACCGAACAG and 5'-CCAGCAGGTGCAACAGAG for the gene encoding PP3744; 5'-GTCAGCAATCGCTGCCAATC and 5'-AAGCGTTATCGAGCGTGTG for the gene encoding PP3746; 5'-CTCGGTGGTGGTGTCTCAAT and 5'-GCGCCA-CATCCACGTAGTTC for the gene encoding PP4987; 5'-GCTATGTGCAGCGTTGGTTG and 5'-CGCCATTGCAGG-TAGCATTC for the gene encoding PP4988 5'-GACCGGT-GATCATGCTCG and 5'-GTGGCGCACCAGATTGGTC for the gene encoding PP5321; 5'-AAAGCCTGATCCAGCCAT and 5'-GAAATTCCACCACCTCTACC for the gene encoding 16S rRNA. Real-time RT-PCR was performed using iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Target cDNA from the experimental and reference samples were amplified in triplicate. Each 25 µl reaction contained 1 µl of a dilution of the target cDNA (1:10-1:10,000), 200 µM dNTPs, 200 nM each primer, 3 mM MgCl₂, 2.5 µl SyBR Green (Molecular Probes, Eugene,

comment

reviews

reports

deposited research

referenced research

interactions

information

OR, USA), and 1 U Platinum *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) in PCR buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl). Samples were initially denatured by heating at 95°C for 10 minutes. A 40-cycle amplification and quantification program was then followed (95°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 20 s) with a single fluorescence measurement per cycle according to manufacturers' recommendations. A final extension cycle (72°C, 1 minute) was performed. PCR products were between 106 and 300 bp in length. To confirm the amplification of a single PCR product, a melting curve was obtained by slow heating from 60°C to 99.5°C at a rate of 0.5°C every 10 s, for 80 cycles, with continuous fluorescence scanning. Results were normalized relative to those obtained for 16S rRNA. Quantification was based on analysis of threshold cycle (Ct) value as described by Pfaffl [47].

Abbreviations

MS medium, Murashige and Skoog medium.

Authors' contributions

MAM performed research. MEU analyzed data and wrote the paper. JJR-H contributed new reagents/analytic tools. JLR contributed to writing. MIR-G designed research, analyzed data and wrote the paper.

Additional data files

The following additional data are available with the online version of this paper. Additional data file 1 is a table listing rhizosphere differentially expressed genes after independent analysis and clustering. Additional data file 2 is a table listing Rhizosphere induced genes after combined analysis applying Bonferroni *P* value correction. Additional data file 3 is a table listing Rhizosphere differentially expressed genes after combined analysis applying Benjamini and Hochberg *P* value adjustment

Acknowledgements

We thank MJ Campos and ML Travieso for technical assistance and E Duque and J de la Torre for providing strains. This work was supported by grants GEN2001-4698-CO5-03, BIO2003-0515, and BFU2006-09078 from the Plan Nacional de I+D+I. MAM is the recipient of a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia. Research contract and funding from the Junta de Andalucía to MIR-G are also acknowledged.

References

1. Molina LA, Ramos C, Duque E, Ronchel MC, García JM, Wyke L, Ramos JL: **Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions.** *Soil Biol Biochem* 2000, **32**:315-321.
2. Morgan JAV, Bending GD, White PJ: **Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere.** *J Exp Bot* 2005, **56**:1729-1739.
3. Marilley L, Aragno M: **Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots.** *Appl Soil Ecol* 1999, **13**:127-136.
4. Bloemberg GV, Lugtenberg BJJ: **Molecular basis of plant growth**

promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol* 2001, **4**:343-350.

5. Lugtenberg BJJ, Bloemberg GV: **Life in the rhizosphere.** In *Pseudomonas Volume 1*. Edited by: Ramos JL. New York: Kluwer; 2004:403-430.
6. Rainey PB: **Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere.** *Environ Microbiol* 1999, **1**:243-257.
7. Ramos-González MI, Campos MJ, Ramos JL: **Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: in vivo expression technology capture and identification of root-activated promoters.** *J Bacteriol* 2005, **187**:4033-4041.
8. Mark GL, Dow JM, Kiely PD, Higgins H, Haynes J, Baysse C, Abbas A, Foley T, Franks A, Morrissey J, et al.: **Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:17454-17459.
9. Verhagen BW, Glazebrook J, Zhu T, Chang HS, van Loon LC, Pieterse CM: **The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2004, **17**:895-908.
10. Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM: **The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms.** *Annu Rev Plant Biol* 2006, **57**:233-266.
11. Lazazzera BA: **Lessons from DNA microarray analysis: the gene expression profile of biofilms.** *Curr Opin Microbiol* 2005, **8**:222-227.
12. Dudoit S, Shaffer JP, Boldrick JC: **Multiple hypothesis testing in microarray experiments.** *Stat Sci* 2003, **18**:71-103.
13. Benjamini Y, Hochberg Y: **Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing.** *J R Statist Soc B* 1995, **57**:289-300.
14. Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, Katayama T, Araki M, Hirakawa M: **From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG.** *Nucleic Acids Res* 2006, **1**:D354-357.
15. Heipieper HJ, Meinhardt F, Segura A: **The cis-trans isomerase of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas* and *Vibrio*: biochemistry, molecular biology and physiological function of a unique stress adaptive mechanism.** *FEMS Microbiol Lett* 2003, **229**:1-7.
16. Junker F, Ramos JL: **Involvement of the cis/trans isomerase Cti in solvent resistance of *Pseudomonas putida* DOT-T1E.** *J Bacteriol* 1999, **181**:5693-5700.
17. Bais HP, Prithiviraj B, Jha AK, Ausubel FM, Vivanco JM: **Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots.** *Nature* 2005, **434**:217-221.
18. Walker TS, Bais HP, Halligan KM, Stermitz FR, Vivanco JM: **Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*.** *J Agric Food Chem* 2003, **51**:2548-2554.
19. Terán W, Krell T, Ramos JL, Gallegos MT: **Effector-repressor interactions, binding of a single effector molecule to the operator-bound TtgR homodimer mediates derepression.** *J Biol Chem* 2006, **281**:7102-7109.
20. Pauly N, Pucciariello C, Mandon K, Innocenti G, Jamet A, Baudouin E, Hérouart D, Frenedo P, Puppo A: **Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-Rhizobium symbiosis.** *J Exp Bot* 2006, **57**:1769-1776.
21. De Vleeschouwer D, Cornelis P, Höfte M: **Redox-active pyocyanin secreted by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 triggers systemic resistance to *Magnaporthe grisea* but enhances *Rhizoctonia solani* susceptibility in rice.** *Mol Plant-Microb Interact* 2006, **19**:1406-1419.
22. Schau M, Eldakak A, Hulett FM: **Terminal oxidases are essential to bypass the requirement for ResD for full Pho induction in *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 2004, **186**:8424-8432.
23. Danhorn T, Hentzer M, Givskov M, Parsek MR, Fuqua C: **Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system.** *J Bacteriol* 2004, **186**:4492-4501.
24. Liras P, Asturias JA, Martin JF: **Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis.** *Trends Biotechnol* 1990, **8**:184-189.
25. Slater H, Crow M, Everson L, Salmond GP: **Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways.** *Mol Microbiol* 2003, **47**:303-320.
26. Iavicoli A, Boutet E, Buchala A, Métraux JP: **Induced systemic**

- resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Mol Plant-Microb Interac* 2003, **16**:851-858.
27. Molina MA, Godoy P, Ramos-González MI, Muñoz N, Ramos JL, Espinosa-Urgel M: **Role of iron and the TonB system in colonization of corn seeds and roots by *Pseudomonas putida* KT2440.** *Environ Microbiol* 2005, **7**:443-449.
 28. Jiménez JJ, Miñambres B, García JL, Díaz E: **Genomic insights in the metabolism of aromatic compounds in *Pseudomonas*.** In *Pseudomonas Volume 3*. Edited by: Ramos JL. New York: Kluwer; 2004:425-462.
 29. Römling U, Amikam D: **Cyclic di-GMP as a second messenger.** *Curr Opin Microbiol* 2006, **9**:218-228.
 30. Whitchurch CB, Leech AJ, Young MD, Kennedy D, Sargent JL, Bertrand JJ, Semmler ABT, Mellick AS, Martin PR, Alm RA: **Characterization of a complex chemosensory signal transduction system which controls twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*.** *Mol Microbiol* 2004, **52**:873-893.
 31. Dörr J, Hurek T, Reinhold-Hurek B: **Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions.** *Mol Microbiol* 1998, **30**:7-17.
 32. O'Toole GA, Kolter R: **Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development.** *Mol Microbiol* 1998, **30**:295-304.
 33. Wong KR, Hughes C, Koronakis V: **A gene, *yaeQ*, that suppresses reduced operon expression caused by mutations in the transcription elongation gene *rfaH* in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.** *Mol Gen Genet* 1998, **257**:693-696.
 34. Courcelle CT, Chow KH, Casey A, Courcelle J: **Nascent DNA processing by RecJ favors lesion repair over translesion synthesis at arrested replication forks in *Escherichia coli*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:9154-9159.
 35. Stohl EA, Seifert HS: ***Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide.** *J Bacteriol* 2006, **188**:7645-7651.
 36. Nakazawa T: **Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world.** *Environ Microbiol* 2002, **4**:782-786.
 37. Nelson KE, Weinel C, Paulsen IT, Dodson RJ, Hilbert H, Martins dos Santos VAP, Fouts DE, Gill SR, Pop M, Holmes M, et al.: **Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440.** *Environ Microbiol* 2002, **4**:799-808.
 38. Espinosa-Urgel M, Ramos JL: **Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440.** *Appl Environ Microbiol* 2004, **70**:5190-5198.
 39. ***Pseudomonas* Reference Culture Collection** [<http://artemis.eez.csic.es/prcc/>]
 40. Koch B, Jensen LE, Nybroe O: **A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site.** *J Microbiol Methods* 2001, **45**:187-195.
 41. Yuste L, Hervás AB, Canosa I, Tobes R, Jiménez JJ, Nogales J, Pérez-Pérez MM, Santero E, Díaz E, Ramos JL, et al.: **Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440 transcriptional machinery analyzed with a genome-wide DNA microarray.** *Environ Microbiol* 2006, **8**:165-177.
 42. Morales G, Ugidos A, Rojo F: **Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome *o* ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the *CIO* and *cbb3-1* terminal oxidases.** *Environ Microbiol* 2006, **10**:1764-1774.
 43. Del Castillo T, Ramos JL, Rodríguez-Herva JJ, Fuhrer T, Sauer U, Duque E: **Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis.** *J Bacteriol* 2007, **189**:5142-5152.
 44. Murashige T, Skoog F: **A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture.** *Physiol Plant* 1962, **15**:473-497.
 45. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York; 1989.
 46. Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP: **Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation.** *Nucleic Acids Res* 2002, **30**:e15.
 47. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acid Res* 2001, **29**:-. e45
 48. **Clustering Tool** [<http://artemisa.eez.csic.es/cluster>]
 49. ***Pseudomonas putida* KT Complete Genome** [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entquery.fcgi?db=genome&cmd=Retrieve&dopt=Protein+Table&list_uids=266]

comment
reviews
reports
deposited research
refereed research
interactions
information

CAPÍTULO 2

***Pseudomonas putida* KT2440 causa resistencia sistémica inducida y cambios en el perfil de los exudados radiculares de plantas de *Arabidopsis thaliana*.**

Autores: Miguel A. Matilla, Juan L. Ramos, Peter A.H.M. Bakker, Rogier Doornbos, Dayakar V. Badri, Jorge M. Vivanco y María Isabel Ramos-González.

Aunque se conocía que *Pseudomonas putida* KT2440 es un eficiente colonizador de la rizosfera de plantas de interés agronómico tales como maíz, tomate y haba, en este trabajo se ha puesto de manifiesto la capacidad de esta bacteria para establecerse en la raíz de la planta de interés básico *Arabidopsis thaliana*. Además se ha evidenciado el potencial de KT2440 en fitoprotección, de modo que desde la raíz protege la parte aérea de la planta de la infección por la bacteria fitopatógena *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), mediante un mecanismo conocido como resistencia sistémica inducida (ISR). Utilizando este sistema modelo *Arabidopsis-Pst* DC3000 se ha identificado una hemoperoxidada extracelular específica de *P. putida*, PP2561, como importante en colonización competitiva y esencial para desencadenar ISR. Resultó de especial interés que se incrementaran los niveles de exudación en plantas colonizadas por la cepa silvestre KT2440, así como que se modificara el perfil de metabolitos secundarios en los exudados radiculares con respecto a plantas axénicas. Además de estar afectado en colonización competitiva, un mutante PP2561 presenta un fenotipo hipersensible frente al estrés oxidativo y no desencadenó las variaciones específicas en la exudación de las que fue responsable la cepa silvestre. Tras su mención en el primer capítulo, la resistencia frente al estrés oxidativo aparece de nuevo como ventaja selectiva en la rizosfera y de forma indirecta sobre la inducción de ISR. Estos resultados revelan nuevos mecanismos a tener en cuenta en el estudio de un hecho complejo como es la adquisición por las plantas de la resistencia sistémica frente a patógenos foliares.

Environmental Microbiology Reports
2010, en prensa

***Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance (ISR) and changes in Arabidopsis root exudation**

Miguel A. Matilla^{1,2}, Juan L. Ramos¹, Peter A.H.M. Bakker², Rogier Doornbos², Dayakar V. Badri³, Jorge M. Vivanco³ and María Isabel Ramos-González^{1,3*}.

¹Department of Environmental Protection, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Profesor Albareda 1, Granada 18008, Spain.

²Plant-Microbe Interactions, Department of Biology, Utrecht University, The Netherlands.

³Department of Horticulture and Landscape Architecture, Colorado State University, 217 Shepardson Building, Fort Collins, CO 80523, USA.

SUMMARY

***Pseudomonas putida* KT2440 is an efficient colonizer of the rhizosphere of plants of agronomical and basic interest. We have demonstrated that KT2440 can protect the model plant *Arabidopsis thaliana* against infection by the phytopathogen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000. *P. putida* extracellular heme-peroxidase (PP2561) was found to be important for competitive colonization and essential for the induction of plant systemic resistance. Root exudates of plants elicited by KT2440 exhibited distinct patterns of metabolites compared to those of non-elicited plants. The levels of some of these compounds were dramatically reduced in axenic plants or plants colonized by a mutant defective in PP2561, which has increased sensitiveness to oxidative stress with respect to the wild type. Thus high-level oxidative stress resistance is a bacterial driving force in the rhizosphere for efficient colonization and to induce systemic resistance. These results provide important new insight into the complex events that occur in order for plants to attain resistance against foliar pathogens.**

Pseudomonas putida KT2440 is used as a model bacterium in biodegradation studies. KT2440 was initially derived from the laboratory domesticated strain *P. putida*

(*arvilla*) mt-2, which is the natural host for the catabolic pWWO plasmid. The metabolic versatility and its vast ability to scavenge iron have been considered, among other features, to be crucial for KT2440 to adapt to multiple niches (Martínez-Bueno *et al.*, 2002; Dos Santos *et al.*, 2004). Recent studies involving KT2440 have demonstrated it to be capable of an efficient colonization of the spermosphere (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000) and rhizosphere of plants of agronomical interest (Molina *et al.*, 2000). In fact, Nakazawa (2002) reported that this bacterium was initially isolated from soil taken from a vegetable garden. This origin provides an explanation for the ability of KT2440 to colonize roots and also suggests that the diversity of nutrients and plant secondary metabolites present in root exudates provide a satisfactory habitat for this bacterium. Therefore exploration of the use of the agrobiotechnological potential of this strain, i.e. biocontrol, is of "a priori" interest. Efficient colonization of the rhizosphere appears to be a requirement for an effective display of bacterial biocontrol properties as antagonism (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000). Besides exhibiting direct mechanisms against plant pathogens, such as niche and resource competition (Lemanceau *et al.*, 1992; Bolwerk *et al.*, 2003), some specific non-pathogenic bacteria, while colonizing the root, can protect plants from pathogen infections in leaf tissues (van Peer *et al.*, 1991; Wei *et al.*, 1991; Kloepper *et al.*, 1992; van Loon *et al.*, 1998; Bakker *et al.*, 2003). This type of resistance is termed induced systemic resistance (ISR). In Arabidopsis, rhizobacteria-mediated ISR requires intact responses to jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) (Pieterse *et al.*, 1998). Another type of systemic resistance known as systemic acquired resistance (SAR) (Ross, 1961) is induced by pathogens. SAR is characterized by an accumulation of endogenously synthesized salicylic acid (SA) (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990) and the expression of pathogenesis-related proteins (van Loon and Strien, 1999).

***P. putida* KT2440 induces systemic resistance in Arabidopsis**

In this work we have evaluated the potential of KT2440 to promote systemic resistance in plants and further investigated the so far unknown contribution of certain bacterial root

* Corresponding author. Phone: (34) 958 181600
Local 116 Fax: (34) 958 129600
E-mail: maribel.ramos@eez.csic.es

Table 1. Bacterial strains and plant lines.

Bacteria and plants	Relevant characteristics	Reference
Bacterial strains		
<i>P. putida</i> KT2440	Wild type	Nakazawa 2002
<i>P. putida</i> KT2440R (KTR)	Rif ^r	Espinosa-Urgel & Ramos 2004
<i>P. putida</i> KT2440RTn7-Sm	miniTn7-Sm specific insertion in KTR; Rif ^r , Sm ^r	Matilla et al., 2007a
KTR PP2561	miniTn5 at PP2561; a Ca ⁺² binding haem peroxidase; Rif ^r , Km ^r	Matilla et al., 2007a
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Pathogen of <i>Arabidopsis</i>	Cuppels 1986
Plant lines		
<i>A. thaliana</i> Col-0	Ecotype Columbia (Col-0) N1092	L.C. van Loon
<i>A. thaliana</i> <i>etr1</i>	ET insensitive mutant	Bleecker et al., 1988
<i>A. thaliana</i> <i>jar1</i>	JA response mutant	Staswick et al., 1992
<i>A. thaliana</i> <i>npr1</i>	Mutant in defence regulatory protein NPR1 at the convergence of JA and SA signalling pathways	Cao et al., 1994
<i>A. thaliana</i> NahG	Transgenic plant expressing the bacterial <i>nahG</i> gene encoding salicylate hydroxylase	Delaney et al., 1994

Km^r, kanamycin resistant; Rif^r, rifampin resistant

colonization traits to elicitation of ISR. For studying ISR, the model plant pathogen system *Arabidopsis thaliana* - *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000) was used as described by Pieterse and coworkers (Pieterse et al., 1996). Briefly, two week old seedlings were planted in potting soil containing *P. putida* cells at two different densities. After four week incubation, the aerial parts of the plants were dipped in a suspension of *Pst* DC3000. The severity of lesions in the leaves was evaluated 4-5 days after infection. Figure 1 shows that KT2440 caused a significant drop in the incidence of disease, with more than a 30% reduction in the disease index, when the higher density of bacteria was present in soil (10⁷ CFU per gram of substrate). Since KT2440 could not be detected on challenged leaves by standard detection techniques (detection limit below 100 CFU per about 15 leaves), we concluded that this effect is mediated by ISR. Although 10⁷ CFU/g is a standard density used with a substantial number of strains for the establishment of ISR in *Arabidopsis* against *Pst*, inoculum size has been shown to be crucial for *P. fluorescens* WCS374, which provides effective protection, in this case, only at a low rhizobacteria density of 10³ CFU/g (Djavaheeri, 2007).

In order to identify plant signaling pathways required for the establishment of ISR by KT2440, different *Arabidopsis* lines (Table 1) were assayed and compared to the wild type

accession Columbia (Col-0): *jar1*, a JA response mutant (Staswick et al., 1992); *etr1*, an ET insensitive mutant (Bleecker et al., 1988); transgenic NahG plants (Delaney et al., 1994) expressing the bacterial *nahG* gene encoding salicylate hydroxylase, which is responsible for the removal of SA and is therefore impaired in SA signaling; and *npr1*, a mutant in the NPR1 transcriptional regulator at the convergence of both ISR and SAR pathways (Cao et al., 1994). The finding that *jar1*, *etr1* and *npr1* lines were unable to develop ISR (Fig. 1B-D) was not surprising since both the JA and ET signaling pathways have been shown to be essential for ISR induced by *P. fluorescens* WCS417r in *Arabidopsis* (Pieterse et al., 1998). However, our results show that for KT2440, plant-produced SA seems to be important to ISR in *Arabidopsis*, since NahG plants did not exhibit induction and/or expression of ISR (Fig. 1E), in contrast to the *Arabidopsis*/WCS417r model system (Pieterse et al., 1996). Yet, a similar result as for KT2440 has been reported for the salicylate siderophore producing bacteria *P. aeruginosa* 7NSK2 in tobacco (De Meyer et al., 1999a) but in this case, bacterial produced SA was the unique determinant of ISR. Nevertheless, 7NSK2 can elicit ISR in NahG *Arabidopsis* (Ran et al., 2005), differently to what was observed with KT2440. One possibility to explain our result is that deprivation of plant produced SA was detrimental for the achievement of systemic

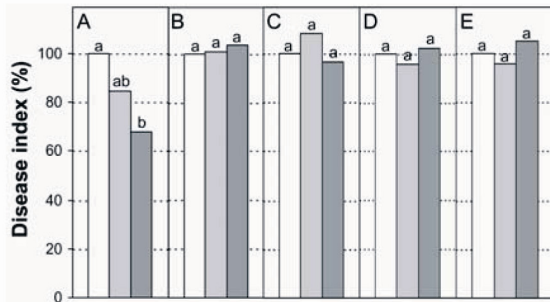


Fig. 1. Induced resistance capacity of KT2440 in different genotypes of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000). For the characterization of KT2440-mediated achievement of ISR, several strains of *Arabidopsis* were used: A, wild-type ecotype Columbia (Col-0); B, mutant *npr1*; C, mutant *jar1*; D, mutant *etr1*; and E, transgenic NahG plants (Table 1). Two week-seedlings were transplanted to soil inoculated with *P. putida* KT2440R (KTR) at final densities of 5×10^3 CFU/g (pale grey) and 5×10^7 CFU/g (dark grey). In control plants (white) substrate was supplemented with MgSO_4 10 mM. Six-week old plants were challenged by dipping the leaves in a suspension of *Pst* DC3000 containing 2.5×10^7 CFU/mL. A detailed experimental procedure is described in S1 in the supplemental material. Disease severity was determined four-five days after infection by calculating the percentage of diseased leaves per plant. Leaves were scored as diseased when showing necrotic or water-soaked lesions surrounded by chlorosis as described before (Pieterse *et al.*, 1996). Rate of diseased leaves per plant line differed as follows: 58% (Col-0), 72% (*npr1*), 52% (*jar1*), 66% (*etr1*), and 66% (NahG). Data were statistically analyzed using one-way analysis of variance followed by Fisher's LSD test ($n = 20$ plants; $\alpha = 0.05$). Different letters indicate significant difference between treatments. Disease index corresponds to the mean in the percentage of diseased leaves per treatment relative to that of the control plants (100%). One experiment representative of three replicates is shown.

resistance by KT2440 and therefore this strain might elicit both the ISR and the SAR pathway. In view of the observation of van Wees and coworkers (2000), this simultaneous activation of both pathways might lead to increased disease suppression. Alternatively, from our experiments we can not rule out a pleiotropic effect in NahG plants related to the accumulation of catechol (van Wees and Glazebrook, 2003). In this context, bacterial colonization of the NahG *Arabidopsis* root has been demonstrated to be hampered (Rudrappa *et al.*, 2007) and the subsequent lack of the plant-bacteria interaction is expected to be crucial for ISR elicitation. Further studies considering a wider variety of rhizobacteria and plant mutants are required to generalize the

requirement of signaling molecules such as SA, ET and JA on the induction of ISR.

Heme peroxidase mutant fails to elicit ISR

While root colonization by specific bacteria of many different genera can reduce disease in foliar tissue against various pathogens, bacterial ISR determinants that have been identified so far seem to be specific to the pair plant/pathogen (Meziane *et al.*, 2005). Bacterial traits that have been shown to be important for ISR are flagella, LPS, certain antibiotics, and iron chelating and iron regulated compounds (Höfte and Bakker, 2007). Bacterial volatiles (Ryu *et al.*, 2004) and the quorum sensing molecules N-acyl-L-homoserine lactones (Schuhegger *et al.*, 2006) have also been shown to trigger ISR. We have observed that close physical interaction occurs between plant root and bacteria by using scanning electron microscopy (our unpublished results). On this basis and with the aim of unveiling putative determinants for effective ISR between *Arabidopsis* and KT2440, we focused on bacterial traits preferentially expressed in the rhizosphere and with a putative extracellular location. For this we took advantage of recently published bacterial *rup* (rhizosphere up-regulated) genes, identified as consistently induced in the first genomic analysis of a bacteria in the rhizosphere, which was carried out with KT2440 (Matilla *et al.*, 2007a). It was reported in this work that a bacterial mutant in PP2561, a large heme peroxidase 3619 amino acids long, was hampered in competitive colonization of the maize rhizosphere and same result has been observed with independent mutants at different positions of the gene (not shown). Flanking the monocistronic gene encoding PP2561 and divergently transcribed was *rup2560*, which had been identified by its induction in the rhizosphere as mentioned above for the *rup* genes. The PP2560 protein is annotated as a type I secretion system (TISS) ATPase. This TISS is encoded in the negative strand by what appears to be an operon consisting of the orfs PP2558 through PP2560. PP2561 is very likely a protein secreted by the flanking TISS. This protein presents a serralyisin C-terminal domain, containing calcium-ion binding domains, which is found within most, if not all, gene products secreted by the type I pathway (Delepelaire, 2004). The analysis of available bacterial genomes reveals that PP2561 is *P. putida* species-specific. Our results in *Arabidopsis* with strain PP2561 showed that this mutant was severely hampered in competitive colonization with the wild type (Fig.

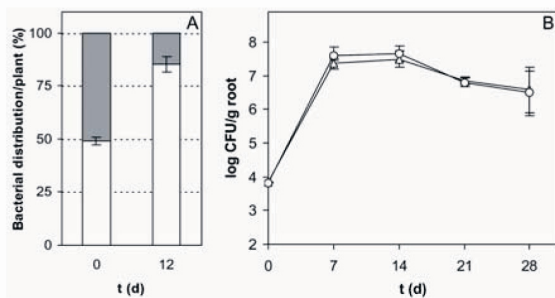


Fig. 2. Colonization ability of *P. putida* wt and *rup* mutant strains in the rhizosphere of *A. thaliana*. KTRTn7-Sm (Matilla *et al.*, 2007a) was used as the wild-type strain in the experiments in order to utilize its resistance marker in competition assays with the PP2561 mutant. KTRTn7-Sm and KTR strains are equally competitive in root colonization (not shown). Competitive colonization of KTRTn7-Sm and PP2561 mutant (A), independent colonization of KTRTn7-Sm and PP2561 mutant (B). Seeds were surface sterilized in bleach for 1 min vortexing and rinsed five times in sterile distilled water. Germination took place on Musharige and Skoog (MS)-agar (0.8%). Commercial MS medium (Caisson laboratories, Inc MSP P0509) adjusted to pH 5.8 was supplied with sucrose 1% (w:v). The obtained seven-day seedlings were transplanted, incubated and watered as described in supplementary material (S1). For assessing colonization, roots were vortexed for 1 min in MgSO₄ 10 mM and serial dilutions were plated on KB-agar (King *et al.*, 1954) (1.5%) medium supplied with cycloheximide, 40-100 µg/mL, rifampin, 10 µg/mL, and streptomycin, 100 µg/mL, for selecting KTRTn7-Sm (circles), or kanamycin, 25 µg/mL for selecting the *rup* mutant (triangles), respectively. In A, CFU attached per g of seed is shown at the initial time. Circles correspond to KTRTn7-Sm and triangles to PP2561. In B, white and grey corresponds to the KTRTn7-Sm and PP2561 mutant strains, respectively. Error bars represent the standard deviation for ten (A) and six plants (B), respectively. Colonization assays were highly reproducible between experiments.

2A), such that after twelve days in the rhizosphere the wt strain had displaced the mutant from 50 to 15%. This result corroborated previous findings with maize plants (Matilla *et al.*, 2007a). We also found that the mutant PP2561 was more sensitive to oxidative stressors such as cumene and tertbutyl hydroperoxides than the wild type (our unpublished results) and that the colony size of this strain was smaller than that of the wt after recovery from the rhizosphere. It is important to note that this mutant strain did not appear to be compromised in seed adhesion (Espinosa-Urgel, personal communication), nor in its ability to colonize the rhizosphere of *Arabidopsis* in the absence of competition (Figure 2B). Importantly, we found that PP2561 mutant was unable to induce systemic

resistance (Figure 3). Since ISR experiments were performed with KT2440 in competition with native bacteria present in the seeds, the compromised efficiency in competitive colonization of mutant PP2561, likely due to its increased sensitiveness to oxidative stress, seems to be responsible for its inability to achieve ISR.

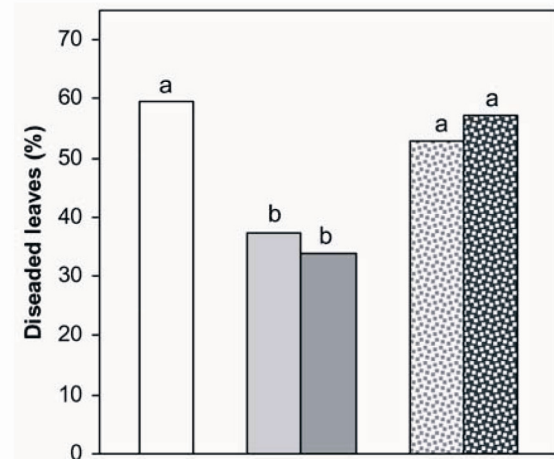


Fig. 3. Induced resistance capacity of *rup* mutants against infection of *Arabidopsis thaliana* Col-0 by *Pst* DC3000. Experiments and statistical analysis were carried out as described in the legend for figure 1. For the treatment with KTR, substrate was inoculated to a final density of 5x10³ CFU/g (pale grey) and 5x10⁷ CFU/g (dark grey), respectively. Identical treatments were used for PP2561 strain (pale and dark dotted). Control plants are shown in white. Experiments were repeated three times. At the lower inoculum density of KT2440, less reproducibility among experiments was observed (Fig. 1 and 3). The PP2561 strain is a mutant derivative of KTR and exhibits kanamycin resistance due to the miniTn5 transposon insertion (Matilla *et al.*, 2007a). The transposon insertion site, between residues 733-734, mapping to the first peroxidase domain, was determined by using arbitrary PCR as reported previously (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000).

Changes in the profile of *Arabidopsis* root exudates in response to KT2440

To our best knowledge no compounds have been identified in root exudates that are specifically involved in ISR, except for galactinol that has been recently identified as a signal of ISR in leaves (Kim *et al.*, 2008). Having found a *P. putida* KT2440 trait, PP2561, that is crucial for ISR in *Arabidopsis*, we decided to explore whether we could use this mutant in order to characterize ISR elicited plant-specific responses that occur at the rhizosphere. One such response that can be measured is changes in the composition of compounds present in root exudates. It has

been proposed that root exudates are important to mediate plant-plant and plant-microbes interactions in the rhizosphere (Bais *et al.*, 2006 and references therein). Furthermore, evidence exists suggesting that the composition of root exudates varies in response to changes in plant-microbe interactions (Kamilova *et al.*, 2006; Phillips *et al.*, 2004). Walker and coworkers demonstrated that chemical and biological (fungal) elicitation induced root secretions containing compounds with antibacterial, antifungal and allelochemical properties (Walker *et al.*, 2003). Modifications in the plant exudates have been reported to not only be linked to elicitation but also to increased susceptibility of the plant to disease. Thus, Bias and coworkers (2005) demonstrated that bacterial pathogens can avoid the presence of antimicrobials in plant exudates, in order to bring about their own infection. This indicates that changes in root exudation represent a key feature through which putative compounds involved in communication between plants and bacteria may be characterized. Furthermore, it appears that changes in exudates might occur during ISR, since the exogenous application of methyl jasmonate to plants, an analogue of jasmonic acid, which is a signaling molecule for ISR in some bacterial strains, induced important increases of phytochemicals in root exudates (Badri *et al.*, 2008).

In order to gain insight into KT2440-mediated ISR, we compared the root exudates profile of sterile *Arabidopsis thaliana* cultivated “in vitro” and gnotobiotic plants incubated with KT2440, by using HPLC-MS analyses. To obtain the exudates, seven day-old axenic seedlings were transferred to 4 mL MS medium supplied with sucrose 1% in 6-wells plates and incubated under low light intensity (70 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, 15/9 h light/dark, 24°C and 20°C, respectively). Eighteen-day-old plants were gently washed with sterile distilled water, transferred to either fresh MS medium, or MS inoculated with *P. putida* KT2440 at 10^5 CFU/mL. Plants were further incubated for 24h. To obtain bacterial supernatant as a control to compare with, an overnight LB culture was washed in MS media and a bacterial suspension in same media containing 10^5 CFU/mL was incubated for 24h. An interesting finding in our study was that KT2440 increased the organic phase of the root exudation (Fig. 4A). Similar observations were made by Meharg and Killham (1995) who reported that perennial ryegrass increased the secretion of root exudates by 12% in the presence of metabolites derived from *P. aeruginosa*. We do not think that the enhancement of exudation in our experiments

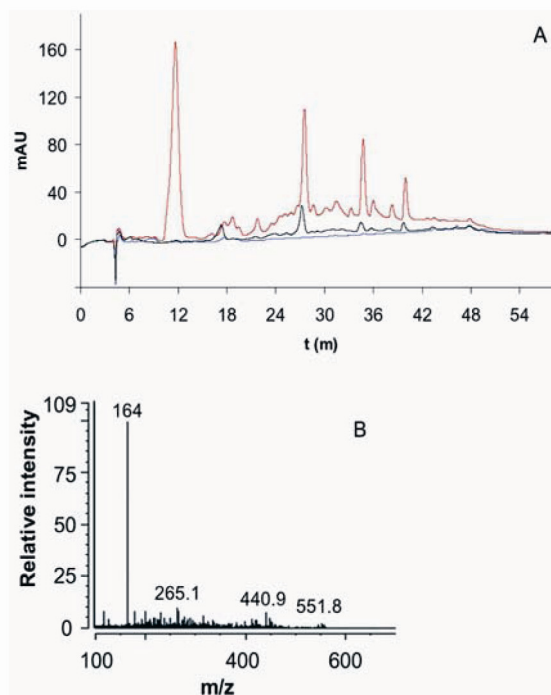


Fig. 4. Effect of the KT2440 bacteria upon the exudates profile of *Arabidopsis*. A, HPLC chromatograms of plant secondary metabolites profile (black, plants control; red, bacteria treated plants; blue, bacterial supernatant) at 254 nm. Treatment experiments were carried out in triplicate and each replicate contained either the pooling of twelve plants exudates (4 mL/plant) or 48 mL of bacterial suspension. Plant exudates and bacterial supernatant were centrifuged, filter sterilized, freeze-dried and dissolved in water acidified to pH 2.8. Samples were partitioned with ethyl acetate (1:1; vol:vol) two times and the organic phase was collected and dried under a nitrogen atmosphere. The dried samples were dissolved in methanol and submitted to HPLC on an Ascentis C18 reverse phase column (5 μM particle size 25 cm x 4.6 mm, Sigma 581340-U), which was coupled to a quadrupole mass spectrometer (MSQ-MS, Thermo Electron Co., Waltham, MA). Samples were loaded onto the column equilibrated with an aqueous solution containing 10% methanol and 0.1 % acetic acid. Compounds were eluted by a linear gradient increasing the methanol concentration to 90 % during 40 min followed by an isocratic step for additional 15 min. At all times a flow rate of 0.7 mL/min was applied. B, mass spectrum of the principal HPLC peak (at 11 min retention time) recorded in the positive ionization mode. In the negative ionization mode the major peak of this sample was at a m/z ratio of 162. No major differences were observed among replicates. Experiments were repeated three times with high reproducibility.

was caused only by the lowered exudates concentration in the vicinity of the root, as a consequence of the presence of exudates-utilizing bacteria, given that axenic plants

exudates were replaced with fresh medium and so the exudates concentration also reduced. A similar finding to ours has been reported for *P. putida* in wheat (Přikryl and Vančura, 1980). Upon subjecting the organic phase of the exudates to HPLC, we observed a principal peak with a retention time (RT) of ~11 minutes in the exudates of KT2440-incubated plants, unnoticeable both in the exudates of plant alone and in the supernatant of 24h MS-cultivated bacteria (Fig. 4A). The area of the peak increased with the bacterial inoculum size (between 10^5 and 10^7 CFU/mL) and with the incubation time up to 72 h (not shown). Using mass spectrometry in the positive- and negative-ionization mode, mass to charge ratios of 164.0 and 162.0, respectively, were assigned to this principal peak under acidic conditions (Fig. 4B). The maximum of UV spectrum for this peak was 272 nm, which is consistent with an aromatic nature. Analyses of other peaks in the higher molecular weight range indicated that these mass traces correspond to the monocharged state of the compound, consistent with a mass of 163.0 Da. This compound was not found in bacteria free supernatants of MS-cultivated bacteria. However, trace quantities of a compound with same RT and mass were detected in the samples of axenic Col-0 plant exudates as an indication that the compound is derived from the plant (not shown).

In order to determine whether this 163 Da compound is involved in ISR, we compared the levels of this compound present in root exudates between Arabidopsis incubated with wt KT2440 versus the mutant PP2561, which we have shown is unable to stimulate ISR. Bacterial densities of wt and mutant strains growing in Arabidopsis root exudates were similar, although because of a smaller size of the PP2561 mutant cells, the turbidity reached in the latter case was diminished. The profile of secondary metabolites in these exudates is shown in Figure 5. Along with a reduction in several peaks within the exudates of plants colonized by the mutant PP2561, the peak corresponding to the 163 Da compound showed a dramatic reduction versus the wt strain (more than thirty fold). As an extra measure, we also subjected aliquots of the exudates “ex-planta” from axenic plants to *P. putida* KT2440 versus the mutant PP2561 and a very similar profile of metabolites was obtained in both cases, thus excluding the 163 Da compound being the result of any bacterial modification that the mutant was unable to perform (data not shown). It seems therefore that the presence of these compounds in plant exudates is important for ISR, and that they

may provide an important readout of the plant-bacteria signaling that is required for successful ISR. Whether the extracellular heme peroxidase encoded by locus PP2561 might have a role in inducing systemic resistance by other means that affecting competitive colonization when added “in vitro” is subject of current work. In addition further biochemical characterization of this protein will help to understand the possible role that a heme peroxidase could have in inducing systemic resistance.

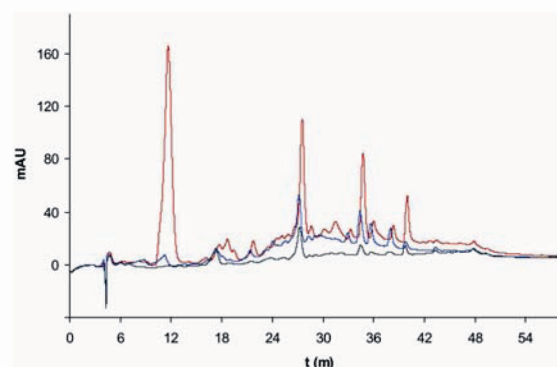


Fig. 5. Exudates profiles of Arabidopsis plants in the presence of the wild type KT2440 and the mutant PP2561 negative in ISR. Methods used were similar to those described in panel A of Figure 4, except that plants were incubated with KT2440 (red) or with mutant PP2561 (blue); grey chromatogram corresponds to plants control.

Acknowledgements

M.A. Matilla is the recipient of a grant from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC). We would like to thank S. Santamaría for providing us with the PP2561 mutant. We would also like to thank M.L. Travieso for technical assistance and B. Pakuts for correcting the English in the manuscript. C.D. Broeckling assisted us with HPLC-MS facilities and T. Krell helped with the interpretation of mass spectrometry results. This work was supported by a grant from MEC (BFU2006-09078) to M.I.R.G, whom was recipient of a fellowship from The Junta de Andalucía for the completion of a short-term work placement at Colorado State University. The work carried out at the J.M.V. laboratory was supported by a grant from the NSF (MCB-0542642).

References

- Bais, H.P., Prithiviraj, B., Jha, A.K., Ausubel, F.M., and Vivanco, J.M. (2005) Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* **434**: 217-221.

- Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, T.L., Gilroy, L.G.S., and Vivanco, J.M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu Rev Plant Biol* **57**: 233-266.
- Badri, D.V., Loyola-Vargas, V.M., Du, J., Stermitz, F.R., Broeckling, C.D., Iglesias-Andreu, L., and Vivanco, J.M. (2008) Transcriptome analysis of Arabidopsis roots treated with signalling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytologist* **179**: 209-223.
- Bakker, P.A.H.M., Ran, L.X., Pieterse, C.M.J., and van Loon, L.C. (2003) Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Can J Plant Pathol* **25**: 5-9.
- Bleecker, A.B., Estelle, M.A., Somerville, C., and Kende, H. (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **241**: 1086-1089.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A.L., Wijffes, A.H., Lamers, G.E., Chin-A-Woeng, T.F., Lugtenberg, B.J., and Bloemberg, G.V. (2003) Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol Plant-Microbe Interact* **16**: 983-993.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., and Dong, X. (1994) Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**: 1583-1592.
- Chin-A-Woeng, T.F., Bloemberg, G.V., Mulders, I.H., Dekkers, L.C., and Lugtenberg, B.J. (2000) Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol Plant-Microbe Interact* **13**: 1340-1345.
- Cuppels, D.A. (1986) Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl Environ Microbiol* **51**: 323-327.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., et al. (1994) *Science* **266**: 1247-1250.
- Delepelaire, P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1694**: 149-161.
- De Meyer, G., Audenaert, K., and Höfte, M. (1999a) *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur J Plant Pathol* **105**: 513-517.
- De Meyer, G., Capieau, K., Audenaert, K., Buchala, A., Métraux, J. -P., and Höfte, M. (1999b) Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**: 450-458.
- Djavaheri, M. (2007) Iron regulated metabolites of plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* WCS374: Their role in induced systemic resistance. *PhD Thesis*. Utrecht, The Netherlands: University of Utrecht.
- Dos Santos, V.A., Heim, S., Moore, E.R., Strätz, M., and Timmis, K.N. (2004) Insights into the genomic basis of niche specificity of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **6**: 1264-1286.
- Espinosa-Urgel, M., and Ramos, J.L. (2004) Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5190-5198.
- Espinosa-Urgel, M., Salido, A., and Ramos, J.L. (2000) Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *J Bacteriol* **182**: 2363-2369.
- Höfte, M., and Bakker, P.A.H.M. (2007) Competition for iron and induced systemic resistance by siderophores of plant growth promoting rhizobacteria. In *Soil Biology Microbial Siderophores*. Varma, A., and Chincholkar, S.B. (eds). Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, pp. 121-133.
- Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Makarova, N., and Lugtenberg, B. (2006) Effects of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and of the biocontrol bacterium *Pseudomonas fluorescens* WCS365 on the composition of organic acids and sugars in tomato root exudate. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 1121-1126.
- Kim, M.S., Cho, S.M., Kang, E.Y., Im, Y.J., Hwangbo, H., Kim Y.C., et al. (2008) Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**: 1643-1653.
- King, E.O., Ward, M.K., and Raney, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**: 301-307.
- Kloepper, J.W., Tuzun, S., and Kuc, J.A. (1992) Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci Technol* **2**: 349-351.
- Lemanceau, P., Bakker, P.A., De Kogel, W.J., Alabouvette, C., and Schippers, B. (1992) Effect of pseudobactin 358 production by *Pseudomonas putida* WCS358 on suppression of fusarium wilt of carnations by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *Appl Environ Microbiol* **58**: 2978-2982.
- Malamy, J., Carr, J., Klessing, D.F., and Raskin, I. (1990) Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002-1004.
- Martínez-Bueno, M.A., Tobes, R., Rey, M., and Ramos, J.L. (2002) Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Environ Microbiol* **4**: 842-855.
- Matilla, M.A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J.J., Ramos, J.L., and Ramos-González, M.I. (2007a) Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol* **8**: R179.
- Matilla, M.A., Ramos, J.L., Duque, E., Alché J.D., Espinosa-Urgel, M., and Ramos-González, M.I.

- (2007b) Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **9**: 1842-1850.
- Meharg, A.A., and Killham, K. (1995) Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of microorganisms. *Plant Soil* **170**: 345-349.
- Métraux, J.-P., Signer, H., Ryals, J., Wardm, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., *et al.* (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006.
- Meziane, H., van Der Sluis, I., van Loon, L.C., Höfte, M., and Bakker, P.A.H.M. (2005) Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol Plant Pathol* **6**: 177-185.
- Molina, L., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M.C., García, J.M., Wyke, L., and Ramos, J.L. (2000) Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol Biochem* **32**: 315-321.
- Nakazawa, T. (2002) Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ Microbiol* **4**: 782-786.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., *et al.* (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.
- Phillips, D.A., Fox, T.C., King, M.D., Bhuvaneshwari, T.V., and Teuber, L.R. (2004) Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant Physiology* **136**: 2887-2894.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Hoffland, E., van Pelt, J.A., and van Loon, L.C. (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225-1237.
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., *et al.* (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1571-1580.
- Přikryl, Z., and Vančura, V. (1980) Root exudates of plants, VI. Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant Soil* **57**: 69-83.
- Ran, L.X., van Loon, L.C., and Bakker, P.A.H.M. (2005) No role for bacterially produced salicylic acid in rhizobacterial induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. *Phytopathology* **95**: 1349-1355.
- Ross, A.F. 1961. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**: 340-358.
- Rudrappa, T., Quinn, W.J., Stanley-Wall, N.R., and Bais, H.P. (2007) A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta* **226**: 283-297.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W., and Paré, P.W. (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**: 1017-1026.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., *et al.* (2006) Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant Cell Environ* **29**: 909-918.
- Serino, L., Reimann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P., and Haas, D. (1995) Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* **249**: 217-228.
- Shin, S.H., Lim, Y., Lee, S.E., Yang, N.W., and Rhee, J.H. (2001) CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J Microbiol Methods* **44**: 89-95.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., and Lehman, C.C. (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 6837-6840.
- van Loon, L.C., and van Strien, E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**: 85-97.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., and Pieterse C.M.J. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **36**: 453-483.
- van Peer, R., Niemann, G.J., and Schippers, B. (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* **81**: 728-734.
- van Wees, S.C., de Swart, E.A., van Pelt, J.A., van Loon, L.C., and Pieterse, C.M. (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8711-8716.
- van Wees, S.C., and Glazebrook, J. (2003) Loss of non-host resistance of *Arabidopsis* NahG to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J* **33**: 733-742.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Halligan, K.M., Stermitz, F.R., and Vivanco, J.M. (2003) Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *J Agric Food Chem* **51**: 2548-2554.
- Wei, G., Kloepper, J.W., and Tuzun, S. (1991) Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant-growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* **81**: 1508-1512.

CAPÍTULO 3

La temperatura y la adquisición de hierro mediada por el sideróforo pioverdina regulan la motilidad en superficie de *Pseudomonas putida*.

Autores: Miguel A. Matilla, Juan L. Ramos, Estrella Duque, Juan de Dios Alché, Manuel Espinosa-Urgel y María Isabel Ramos-González.

Al inicio de este trabajo no se había caracterizado el movimiento en superficie de bacterias de la especie *Pseudomonas putida*. La cepa KT2440 no presenta motilidad tipo "swarming" a 30°C, su temperatura de cultivo habitual en el laboratorio. Sin embargo, esta bacteria muestra un movimiento en superficie similar al que presentan otras especies de *Pseudomonas* a temperaturas comprendidas entre 18 y 28°C. Las células de KT2440 que exhiben "swarming" se caracterizan por estar alargadas, presentar apéndices en su superficie y ser hipermóviles de una forma organizada. Mediante el análisis de una batería de mutantes hemos identificado una serie de determinantes moleculares requeridos para la realización de "swarming" en KT2440. Así, este movimiento depende del antígeno-O lipopolisacárido y de los pili de tipo de IV. Aunque mutantes en flagelos presentan un movimiento macroscópicamente indistinguible al de la cepa silvestre, la observación microscópica reveló que dichos mutantes se mueven en superficie mediante un mecanismo diferente que transcurre sin manifestación de hipermovilidad. Mutantes deficientes en la síntesis del sideróforo pioverdina (*ppsD*) y su receptor (*fpvA*) también son defectivos en la realización de "swarming". La motilidad del mutante *ppsD* se restauró totalmente mediante la incorporación de pioverdina purificada al medio y parcialmente mediante la complementación genética de la mutación, sin bien, como era previsible, no se reestableció el "swarming" del mutante *fpvA* con la adición de pioverdina. Este trabajo constituye la primera evidencia que asigna un papel fundamental a la captura de hierro mediada por el sideróforo pioverdina en el movimiento bacteriano coordinado, lo que sugiere que, en *P. putida*, la concentración intracelular del micronutriente es determinante para la colonización de superficies.

Environmental Microbiology
Vol 9, N° 7, pp. 1842-1850, Febrero, 2007.

Brief report

Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*

Miguel A. Matilla,¹ Juan L. Ramos,¹ Estrella Duque,¹ Juan de Dios Alché,² Manuel Espinosa-Urgel¹ and María Isabel Ramos-González^{1*}

Departments of ¹Environmental Protection and ²Plant Biochemistry and Molecular and Cellular Biology, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda, 1 Granada 18008, Spain.

Summary

Pseudomonas putida KT2440 is unable to swarm at its common temperature of growth in the laboratory (30°C) but exhibits surface motility similar to swarming patterns in other *Pseudomonas* between 18°C and 28°C. These motile cells show differentiation, consisting on elongation and the presence of surface appendages. Analysis of a collection of mutants to define the molecular determinants of this type of surface movement in KT2440 shows that while type IV pili and lipopolysaccharide O-antigen are requisites flagella are not. Although surface motility of flagellar mutants was macroscopically undistinguishable from that of the wild type, microscopy analysis revealed that these mutants move using a distinct mechanism to that of the wild-type strain. Mutants either in the siderophore pyoverdine (*ppsD*) or in the FpVA siderophore receptor were also unable to spread on surfaces. Motility in the *ppsD* strain was totally restored with pyoverdine and partially with the wild-type *ppsD* allele. Phenotype of the *fpvA* strain was not complemented by this siderophore. We discuss that iron influences surface motility and that it can be an environmental cue for swarming-like movement in *P. putida*. This study constitutes the first report assigning an important role to pyoverdine iron acquisition in *en masse* bacterial surface movement.

Swarming motility is a social form of movement that enables bacteria to travel rapidly and *en masse* atop solid

surfaces. Usually this surface translocation requires the production of wetting agents (Daniels *et al.*, 2004; Berg, 2005). *Pseudomonas putida* KT2440 is a derivative of its ancient isolate *P. putida* mt-2, whose history was discussed in detail by Nakazawa (2002). KT2440 does not swarm under standard growth conditions, either on rich LB medium or glucose-supplied M9 minimal media. To our knowledge there are no reports in the literature that contemplate surface motility in this strain or any other of *P. putida*. However, the capacity for surface-colonizing migration is increasingly recognized as a widespread trait in eubacteria (Harshey, 1994; Fraser and Hughes, 1999). Investigating surface motility in this agricultural soil bacterium (Molina *et al.*, 2000) could be of interest because it might confer advantages in natural environments by facilitating rapid colonization. As an indication of this, more noticeable swarming has been reported for undomesticated isolates than for laboratory strains (Kearns and Losick, 2003). Disruption of cell-to-cell signalling systems in several organisms abolishes *luxI/luxR*-mediated swarming migration (Daniels *et al.*, 2004). Although the most common autoinducers such as acyl homoserine lactones are not produced by KT2440 (Nelson *et al.*, 2002), some indirect evidences point towards the existence of gene regulation in response to cell density in this strain (Espinosa-Urgel and Ramos, 2004). Therefore investigating swarming of KT2440 might reveal unknown quorum sensing-like systems acting in this strain.

We tested the ability of KT2440 to move on several semisolid media at the standard agar concentration (0.5%) used to test swarming, including that used to test this type of motility in *Pseudomonas aeruginosa* (Toutain *et al.*, 2005), and found that this bacterium was unable to move at 30°C on any of the media assayed. Accidentally, we observed motility on PG-agar medium (consisting of proteose peptone No. 3 (Difco 212693), 0.5%, and glucose, 0.2%, with Difco Bacto-Agar) in plates left for 2 days on the bench (~22°C). Thus, we analysed the effect of temperature upon surface motility on PG-agar (0.5%) and found that rapid *en masse* movement similar to swarming was observed in the range between 18°C and 28°C, while none took place at 30°C, the usual growth temperature of this strain. Stimulation of swarming at low

Received 28 November, 2006; accepted 7 February, 2007.
*For correspondence. E-mail maribel.ramos@eez.csic.es; Tel. (+34) 958 181600 local 116; Fax (+34) 958 129600.

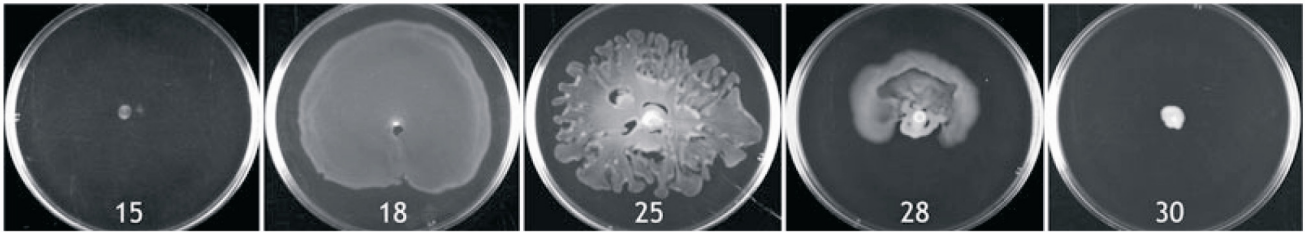


Fig. 1. Surface motility pattern of *Pseudomonas putida* KT2440 at different temperatures. Two and a half microlitres of an overnight LB (Sambrook *et al.*, 1989) culture was spotted onto the centre of Petri dishes containing 25 ml of PG-swarming agar (0.5%). Active motile cells were obtained after incubation at 25°C for 50 h. Afterwards cells from the edge of the surface structure of growth were spotted on fresh PG-agar plates and incubated at the indicated temperatures (°C) for 18 h. Replacement of proteose peptone No. 3 for Bacto-peptone (Difco 212677) did not support surface motility. The picture is representative of two replicates in three different experiments. The same motility pattern was observed for the KT2440R strain (Table 1).

temperatures has been observed in other organisms (Lai *et al.*, 2005). Temperature also influences the motility pattern, which was dendritic at 25°C and concentric with a smooth appearance at 18°C (Fig. 1). Temperature fluctuations are often associated in nature with alterations in humidity so that low temperature could be an indicator of 'softness' of the surrounding medium for the bacterial cells. Rapid surface migration (approximately 0.5 cm h⁻¹ at 25°C) was preceded by a lag period (variable although longer than 24 h, at any temperature of incubation), which was eliminated when active motile cells from the edge of surface migration were used as the inoculum instead of cells from an overnight culture. This 'memory' of differentiation was maintained after incubating for more than 50 generations in LB at 30°C, which was interpreted as an indication of emergent genetic variants more than as physiological adaptation.

Pseudomonas putida KT2440 bacterial cells exhibit a vigorous whirling movement typical of swarmer microorganisms (Harshey, 1994) before and through the expansion on the surface (see Movie S1 in *Supplementary material*). Other characteristics of cells on the edge were: (i) elongation (2.45 µm ± 0.55), in comparison with cells from the centre (1.21 µm ± 0.19), these differences, which

did not arise at 30°C, being greater than the changes in length experienced by *P. aeruginosa* swarmer cells (Rashid and Kornberg, 2000), (ii) the presence of thin appendages, probably type four pili (TFP) on the cell surface and (iii) the existence of septum in those cells with polar flagellum (Fig. 2). Most of the previously described swarming bacteria are peritrichous but not *P. aeruginosa* (Rashid and Kornberg, 2000).

To investigate whether flagella are necessary for surface motility in KT2440 we used three mutants unable to swim in LB-agar (0.3%) (*fliA*, *fliD* and *flgK*) (not shown). None of them exhibited the characteristic whirl of swarmer cells (see Movie S2 in *Supplementary material*), although unexpectedly they were able to spread on the surface (Movie S2). Thus, even in the absence of flagella *P. putida* exhibits a kind of surface motility macroscopically indistinguishable from that of the wild type, in opposition to the results obtained with *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000; Toutain *et al.*, 2005). There is an antecedent of 'flagellum-independent surface spreading' of *Serratia* (Matsuyama *et al.*, 1995) although at a lower agar concentration (0.35%). However, the flagella-independent surface spreading observed with *P. putida* in this work took place at higher concentration of agar (0.5%). Flagella-

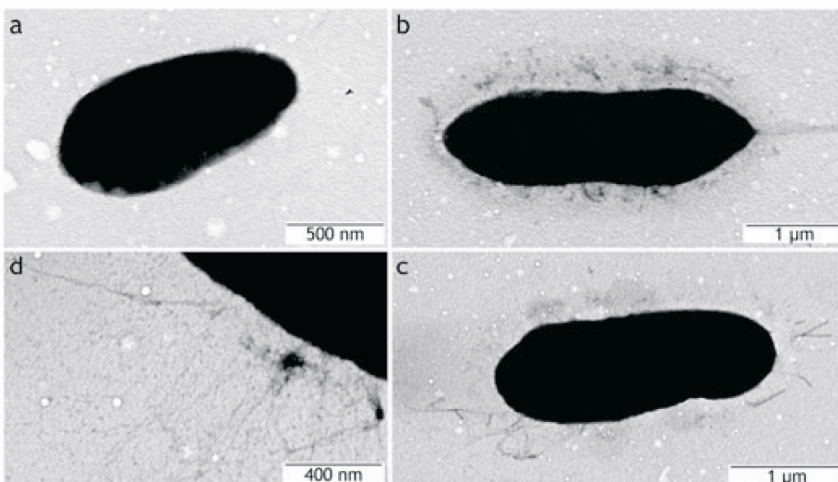


Fig. 2. Transmission electron microscopy of negatively stained bacteria. Bacteria grown on PG-swarming agar (0.5%) were adsorbed on Formvar coated grids, stained with 1% phosphotungstic acid for 30 s (A and B) or 1.5 min (C and D) and air-dried. The grids were observed under a JEOL JEM-1011 transmission electron microscope at 80 kV. A. KT2440 from the centre of the growth area when incubated at 25°C (see Fig. 1) and the same was observed with cells from the border of the bacterial growth spot incubated at 30°C (not shown). B–D. Cells from the edge of the structure of growth (25°C). Similar features were observed with KT2440R (Table 1).

independent rapid surface motility has also been reported for *Bacillus* (Kinsinger *et al.*, 2003), but in that case flagella were not detected in cells from the leading edge of the surface structures of growth. In *P. putida* vigorous rotating movements as indication of motile flagella were observed in cells from the edge of the surface structure (Movie S1) and flagella were observed from these cells under the microscope (Fig. 2). While flagella are required for swimming in liquid and semisolid agar (0.2–0.4%), the retractile filaments TFP are requisite for other types of motility on solid surfaces (twitching) (Mattick, 2002; see Burrows, 2005 for a review). Macroscopic manifestation of twitching in the interface between agar and Petri dish was not displayed by the KT2440 strain after stabbing a culture through the agar to the bottom of the plate (not shown). Besides, the observed rates of twitching, $0.5 \mu\text{m s}^{-1}$ (Skerker and Berg, 2001) and 0.6 mm h^{-1} (Semmler *et al.*, 1999) are insufficient to explain the fast movement observed in KT2440. There exists a controversy about the necessity of pili for swarming of *P. aeruginosa* (Köhler *et al.*, 2000; Toutain *et al.*, 2005), and they were not detected in swarming cells (Rashid and Kornberg, 2000). Therefore we investigated the role of pili as part of the KT2440 surface motility characterization, all the more so because thin surface appendages were observed specifically on active motile cells (Fig. 2). Movement was totally prevented in two mutants in pili biogenesis, *PilD/XcpA*, which is required for type II secretion system, and PP5081, a TFP biogenesis protein with *PilO* and *PilP* domains (Nelson *et al.*, 2002) (Fig. 3). The strict requirement of pili exhibited by *P. putida* to move on surfaces rules out that the observed movement corresponds

to sliding because no motile organelles are required for this type of passive motility (Harshey, 2003). Other evidence of pili in *P. putida* as a response to surface-associated growth was the presence of pilin *PilA* in 12 h biofilms, but not in planktonic cultures (Sauer and Camper, 2001). Our results are in agreement with previous observations in *P. putida* WCS358, where pili were not detected under standard conditions of growth (de Groot *et al.*, 1994). We propose regulation of the expression of these adhesive appendages as a crucial feature for surface motility in *P. putida*.

Although we have observed that an alternative type of pili-dependent rapid movement on surface (different to twitching) is possible in the absence of flagella, we will refer to the surface motility exhibited by *P. putida* KT2440 wild type as swarming, after excluding spreading, sliding, twitching and social gliding motility, such as occurs in *Myxococcus xanthus*, which is essentially the same process (Semmler *et al.*, 1999).

The existence of a diffusible extracellular agent as the key factor responsible for active swarming was discarded by using a mixture of active swarmer (KT2440R) and overnight liquid culture cells (KT2440Tn7- Ω Sm1) as inoculum (Table 1 lists all the strains used in this work). In this experiment after incubation for 36 h at 25°C, only KT2440R cells were recovered from the swarming edge, whereas both strains were recovered from the inoculation midpoint. The same result was obtained by mixing KT2440Tn7- Ω Sm1 swarmer cells and an overnight liquid culture of KT2440R; in this case only KT2440Tn7- Ω Sm1 cells were found in the swarming edge. A similar lag phase and stimulation pattern of swarming motility have

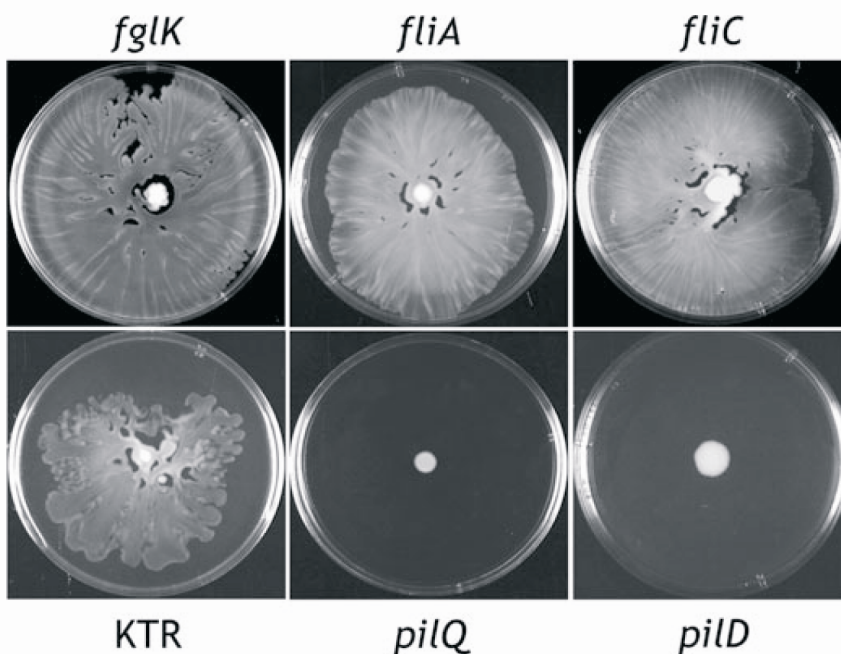


Fig. 3. Role of *P. putida* appendages in surface motility. Strains were cultured in LB medium supplied with rifampin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) or kanamycin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$) when appropriate, for 16 h. Two and a half microlitres (approximately $1.25 \times 10^7 \text{ cfu ml}^{-1}$) was laid on PG-swarming agar (0.5%) with no antibiotics and incubated for 55 h at 25°C. KTR is an acronym for *P. putida* KT2440R, which was used in this experiment as a control because the collection of mutants was derived from KT2440R. The picture is representative of two replicates in three different experiments.

Table 1. Strains used in this work.

Strain	Characteristics/function loss	Reference
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Restriction minus, cured of pWW0 derivative of <i>P. putida</i> mt-2	Nakazawa (2002)
<i>Pseudomonas arvilla</i> mt-2	First deposit of KT2440 ancestor carrying pWW0	ATCC (23973)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440Tn7-ΩSm1	Extragenic site-specific insertion of miniTn7-ΩSm1 near <i>glmS</i> (Koch <i>et al.</i> , 2001)	This work
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440R	Rifampin-resistant derivative of KT2440	Espinosa-Urgel and Ramos (2004)
Mutant (locus)		
<i>algD</i> (PP1288)	GDP-mannose 6-dehydrogenase (alginate synthesis) ^a	M.I. Ramos-González, unpublished
<i>flgK</i> (PP4381)	Flagellar hook-associated protein ^a	PRCC
<i>fliA</i> (PP4341)	Flagellar biosynthesis sigma factor ^a	PRCC
<i>fliC</i> (PP4378)	Flagellin ^a	PRCC
<i>pilD</i> (PP0632)	Type IV pili prepilin peptidase PilD/XcpA ^a	PRCC
<i>pil(O + P)</i> (PP5081)	Type IV pili biogenesis protein ^a	PRCC
<i>ppsD</i> (PP4219)	Non-ribosomal peptide synthetase (pyoverdine synthesis) ^a	PRCC
<i>rmlA</i> (PP1783)	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase ^a	PRCC
<i>rmlC</i> (PP1782)	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase ^a	PRCC
<i>galU</i> (PP3821)	UTP-glucose-1-phosphate uridyltransferase	M. Espinosa-Urgel, unpublished
<i>wbpL</i> (PP1804)	Glycosyl transferase (O-antigen synthesis) ^a	PRCC
<i>wbpW</i> -like (PP1776)	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase ^a	PRCC

a. All of the mutants are derivatives of KT2440R and kanamycin-resistant by the miniTn5 transposon insertion that causes the mutation. The transposon insertion site in all strains was determined by using arbitrary polymerase chain reaction at the PRCC (<http://artemisa.eez.csic.es/prcc/>).

been observed with a *Bacillus subtilis* laboratory strain in opposition to its ancestor strain, which did not exhibit any delay (Kearns and Losick, 2003). To investigate whether the observed lag was due to a similar loss of active swarming in the KT2440 laboratory strain, we analysed the swarming ability of the undomesticated *P. putida* mt-2, which was originally deposited in the American Type Culture Collection (ATCC) as *Pseudomonas arvilla* mt-2. KT2440 and mt-2 strains should be considered the same organism, except for the presence of the TOL plasmid pWW0 (Table 1, Regenhardt *et al.*, 2002). No differences were observed between both strains in their swarming pattern, which took place in the agar range 0.5–0.8%.

Role of LPS in swarming by *P. putida*

Wetting agents synthesized during swarming expansion are chemically diverse, i.e. rhamnolipid precursor in *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 2003; Caiazza *et al.*, 2005); lipopolysaccharides (LPS) in *Salmonella typhimurium* (Toguchi *et al.*, 2000); lipopeptides in *B. subtilis* (Kearns and Losick, 2003). *Pseudomonas putida* KT2440 does not contain the genetic potential required to produce rhamnolipids and is not a mucoid strain under laboratory conditions. Besides, we have not been able to detect any compound with surfactant properties produced by this bacterium using the drop collapsing assay (Kuiper *et al.*, 2004). However, the promoter of the operon for the synthesis of the exopolysaccharide (EPS) alginate (*P_{algD}*) was active in the plant-rhizosphere (Ramos-González *et al.*, 2005). Even so, alginate was discarded as the major EPS forming part of the slime produced by swimmers because

a mutant in *algD*, the first gene in the operon for biosynthesis of alginate, exhibited similar swarming motility as the wild type (not shown). In *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Proteus mirabilis*, LPS have been shown to play a critical role in swarming motility (Belas *et al.*, 1995; Toguchi *et al.*, 2000) and were found to be upregulated in swarmer cells using microarrays analysis (Wang *et al.*, 2004). Therefore we investigated the role of LPS in swarming of *P. putida*, by analysing mutants in the genetic determinants involved in the synthesis of the O-antigen side-chain (PP1776 and *wbpL*). PP1776 is encoded by a *wbpW* homologue. In *P. aeruginosa*, *WbpW* is responsible for the synthesis of nucleotide sugar GDP-D-mannose, a precursor for the O-antigen and the ‘common antigen’ (Lam *et al.*, 2004). The mechanism of O-antigen synthesis begins through the activity of a trans-membrane glycosyl transferase designated *WbpL* in *P. putida* so that a knockout in *wbpL* does not have O-antigen (Ramos-González *et al.*, 1992; Junker *et al.*, 2001). Both mutants in the synthesis of the O-antigen were defective in swarming (not shown). This analysis was completed with two other mutants affected in the *rml* operon and in *galU*, which in *P. aeruginosa* are responsible for the synthesis of the major sugar residues (dTDP-L-rhamnose and UDP-D-glucose respectively) of the outer core oligosaccharide (Lam *et al.*, 2004). The *galU* derivative was defective in swarming as expected, but surprisingly none of the *rml* mutants (*rmlA*, *rmlC*) were affected in this type of motility. With the available information in *P. aeruginosa* (Lam *et al.*, 2004) we cannot quite explain why a mutant in the synthesis of deoxysugar rhamnose, a common component of the core oligosaccharide, might

1846 M. A. Matilla et al.

have O-antigen, but to our knowledge the actual LPS composition of KT2440, or of any other *P. putida* strain, has not been revealed and LPS assemblage in this species is still pending of study. Furthermore, homologues to the *P. aeruginosa* key genes either for the core assembly (*wapR* and *migA*) or for ligation of the O-antigen to the outer core (*waaL*) (Lam *et al.*, 2004) are not present in the KT2440 genome (Nelson *et al.*, 2002).

In agreement to our results with *P. putida*, LPS O-antigen and pili are required for social (S)-motility of *M. xanthus*; however, a direct correlation between them has been discarded, because an O-antigen mutant exhibited normal TFP (Bowden and Kaplan, 1998). It has been known for a long time that *P. aeruginosa* bacterial cells grown at temperatures as low as 17°C present higher levels of the very long O-polymer-containing LPS molecules (McGroarty and

Rivera, 1990), and the same observation was performed when comparing *Yersinia enterocolitica* cells grown at room temperature versus 37°C (Bengoechea *et al.*, 2002). We have analysed the effect of low temperatures upon LPS pattern of *P. putida* cells on PG-medium after purification and electrophoretic separation (Hitchcock and Brown, 1983) and found that was similar between 20°C and 30°C (not shown), which ruled out temperature regulation of O-antigen polymerization as a possible explanation for swarming and accounting for the smooth appearance of the growth structure at low temperatures.

Role of iron in swarming by *P. putida*

Adaptation of bacteria to life on a surface probably requires the recognition of distinctive features of that

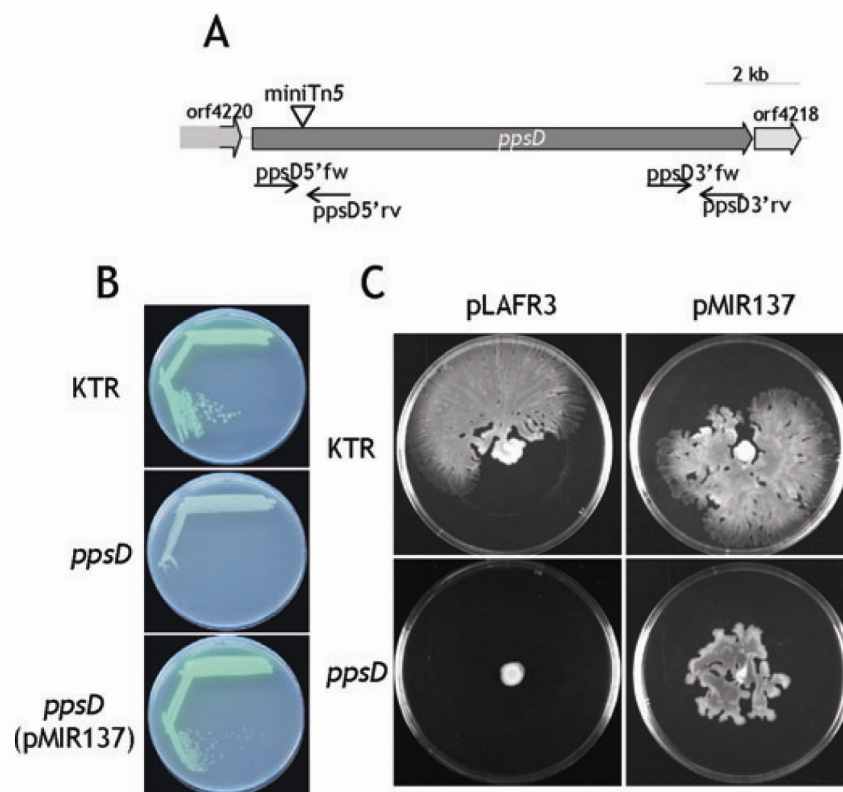


Fig. 4. Complementation of swarming-deficient *P. putida* *ppsD* mutant by a wild-type *ppsD* allele.

A. Genome region contained in pMIR137 cosmid, with an indication of the oligos used to test the presence of the complete *ppsD* gene, *ppsD5'fw* (5'-GTGCAAGCATTGCTCGATTTC3'), *ppsD5'rv* (5'-CAATATGGTGCACGGTCAGC3'), *ppsD3'fw* (5'-CAAACCCACCTGCAAGTCG3') and *ppsD3'rv* (5'-CCCGAAAGCTCATGAAAGTTC3'); PP4218 contains an esterase/lipase protein domain homologous to that found in *P. aeruginosa* type II pyoverdine region sequences (Smith *et al.*, 2005). Transposon insertion site in *ppsD* mutant is shown (at position 885 bp from 5' end).

B. Production of pyoverdine on King's B medium (King *et al.*, 1954) by the wild type (KTR), the pyoverdine-deficient *ppsD* strain and this mutant complemented with cosmid pMIR137. The same result was observed on PG-swarming agar (0.5%).

C. Strains carrying pLAFR3 or pMIR137 were cultured in LB medium supplied with 10 µg ml⁻¹ of tetracycline (Tc) (when KTR was the host) and Tc and kanamycin (when *ppsD* mutant was the host). pLAFR3 is the cosmid cloning vector, which confers Tc resistance (Staskawicz *et al.*, 1987), used for the construction of the gene library. Active swarming cells were spotted onto the centre of Petri dishes containing 25 ml of PG-swarming agar (0.5%) supplied with Tc. After 36 h incubation at 25°C, pictures were taken. The picture for strain KTR (pMIR137) was taken from a plate without Tc, because it did not swarm on Tc; however, cells isolated from the edge still carried cosmid pMIR137. The picture is representative of two replicates in three different experiments.

© 2007 The Authors

Journal compilation © 2007 Society for Applied Microbiology and Blackwell Publishing Ltd, *Environmental Microbiology*, 9, 1842–1850

habitat. Diffusion of iron to cells on solid surfaces is possibly limiting, so that iron limitation could be an indicator of growth on a surface and consequently cause expansion to explore more convenient environments. Interestingly, Singh and colleagues (2002) reported that very low concentrations of available iron, resulting from sequestering, markedly stimulated surface motility, thus preventing biofilm development by *P. aeruginosa*. Moreover, adding iron to certain mutants unable to form a biofilm overcomes the mutations (O'Toole and Kolter, 1998). Fluorescent *Pseudomonas* produce the siderophore pyoverdine, which has an extremely high iron affinity (Ravel and Cornelis, 2003). This molecule has been demonstrated to have a dual function: besides mediating iron transport, pyoverdine has a role in signalling (see Visca *et al.*, 2007 for a review) and there is evidence that pyoverdine can upregulate its own production. In *P. aeruginosa* this has been shown to involve the pyoverdine receptor FpvA protein and the signal-transducing FpvR protein that control the activity of the PvdS sigma factor in response to extracellular pyoverdine (Lamont *et al.*, 2002). This signal also triggers the production of extracellular virulence factors such as exotoxin A (Lamont *et al.*, 2002). Autoinduction of siderophore synthesis in response to the interaction of the ferri- or apopyoverdine with their receptor

could constitute a strategy not only to ensure selective expression of the iron carrier (pyoverdine), but also perhaps to sense cell density. To investigate a possible role of the iron siderophore in swarming, we used a mutant (*ppsD*) defective in the synthesis of pyoverdine (Fig. 4B). PpsD (PP4219) is a non-ribosomal peptide synthetase domain protein homologous to PvdJ(2), which is encoded by a gene found in the *P. aeruginosa* type II pyoverdine region sequence (Smith *et al.*, 2005). The *P. putida ppsD* mutant did not produce any other siderophore (not shown) as revealed with the CAS agar assay (Shin *et al.*, 2001). This *ppsD* mutant was unable to swarm, in spite of showing identical growth to the wild type in liquid and on agar (2%)-PG-medium. A mutant deficient in the pyoverdine receptor (*fpvA*) exhibited a similar phenotype as the *ppsD* mutant (Fig. 6). Cosmid pMIR137 carrying the complete *ppsD* gene was isolated from a KT2440 gene library (Ramos-González, 1993) by colony hybridization (Sambrook *et al.*, 1989). The presence of the complete *ppsD* gene (10 413 bp) was confirmed in pMIR137 (Fig. 4A). Complementation with the pMIR137 cosmid restored the mutant's ability to synthesize pyoverdine (Fig. 4B) and its ability to swarm partially, even though the pLAFR3 cosmid cloning vector (Staskawicz *et al.*, 1987) 'per se' hampered the swarming

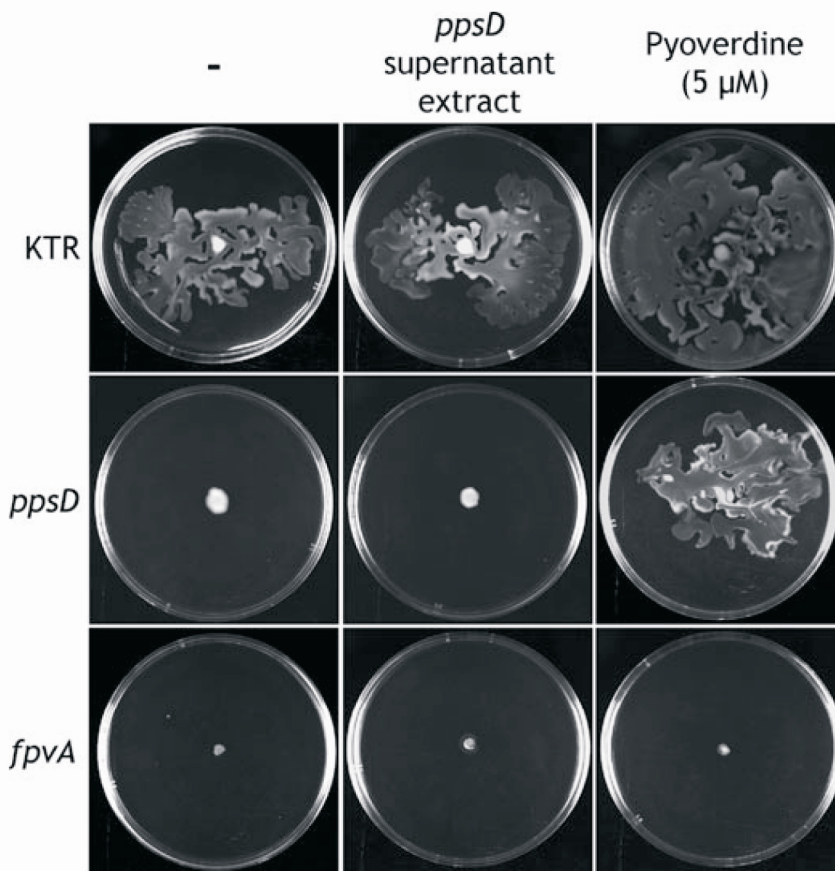


Fig. 5. Restitution of swarming motility to *ppsD* mutant by purified pyoverdine. Active motile KTR cells were obtained as explained in the legend for Fig. 1. To obtain *ppsD* mutant active motile cells, bacteria were incubated on PG-agar (0.5%) supplied with pyoverdine (5 µM). Pyoverdine was purified from the supernatant of KT2440 cultures and quantified as described previously (Raaijmakers *et al.*, 1994). Same procedure was used for the supernatant of *ppsD* mutant, which failed to produce pyoverdine, and equivalent volume to that of 5 µM of the purified pyoverdine solution was used as negative control. Cells from the edge of the surface structure of growth were spotted on fresh PG-agar plates and incubated at 25°C for 20 h. The picture is representative of two replicates in three different experiments.

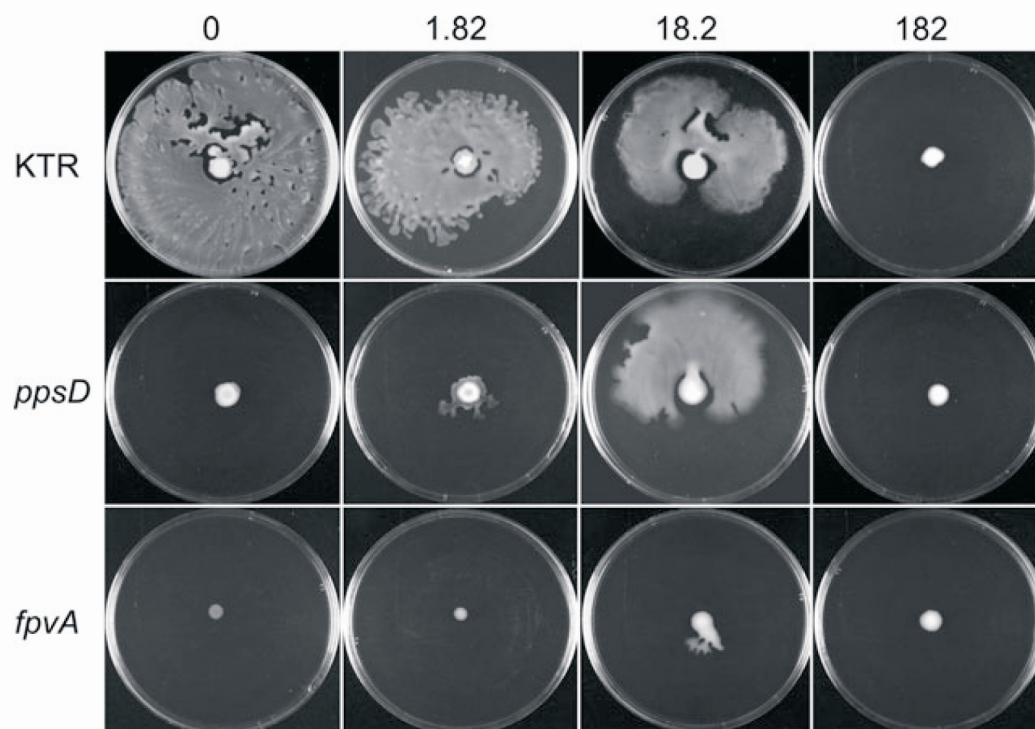


Fig. 6. Effect of ferric iron upon swarming motility of *P. putida* KT2440R, *ppsD* and *fpvA* derivative strains. PG-swarming agar (0.5%) supplemented with different ferric iron concentrations (μM) was inoculated with 2.5 μl from an overnight LB culture supplied with rifampin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$) or kanamycin ($25 \mu\text{g ml}^{-1}$), when appropriate, and incubated as indicated in the legend for Fig. 3. The picture is representative of two replicates in three different experiments.

ability of the wild type to a certain degree. The same was observed with pMIR137 (Fig. 4C). Moreover, pyoverdine extracted from the KT2440 supernatant, in the range 1–5 μM , returns swarming ability to the *ppsD* mutant, while similar extracts obtained from the *ppsD* mutant supernatant could not re-establish motility (Fig. 5). Interestingly, addition of pyoverdine could not return motility to the *fpvA* mutant (Fig. 5). The fact that FeCl_3 at a standard concentration of growth, 18 μM , can substitute for pyoverdine in the swarming ability of the *ppsD* mutant but not that of *fpvA* mutant (Fig. 6) ruled out the possibility that mere diffusion of iron was the mechanism to re-establish motility. The exogenous iron chelate ferric citrate (between 1.8 and 180 μM), whose uptake is independent on pyoverdine, returned motility to the *ppsD* and *fpvA* mutants (not shown). Taken together it seems that the intracellular iron level or an active transport of chelated iron rather than pyoverdine *per se* is the functional signal for swarming in *P. putida*. These results are in agreement with that of Banin and colleagues on the formation of *P. aeruginosa* biofilms (Banin *et al.*, 2005). Ferric ions caused disorganization of the swarming pattern, which affected the wild type and the mutant strains equally (Fig. 6). This disorganized swarming still required pili because iron did not restore surface motility in mutants defective in pili (not shown). A 10-fold higher iron concen-

tration, 182 μM , inhibited swarming motility even in the wild type (Fig. 6), and curiously the same effect was observed by increasing the concentration of the iron chelator 2,2'-bipyridine, which gradually reduced surface motility until it was totally inhibited at a concentration of 0.2 mM, which does not prevent growth (not shown). It seems that a decrease below a certain level of iron inhibits swarming, but an excess also has an inhibitory effect upon surface motility in *P. putida*. Similarly, keeping iron concentration in the medium within a range is decisive for the formation of mushroom-like structures on *P. aeruginosa* biofilms (Visca *et al.*, 2007). Supporting control of swarming by iron, an excess of iron inhibited swarming in *P. aeruginosa* concomitantly with *rhlA* expression (Déziel *et al.*, 2003), which is responsible for the synthesis of the biosurfactant 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanic acids, a precursor of rhamnolipids. The role of iron starvation has long been known in *Vibrio parahaemolyticus*, which in combination with restrictions in movement of the polar flagellum, occurring on solid surface, is the signal of swarming cell differentiation (McCarter and Silverman, 1989). More recently, in gene expression studies of *S. typhimurium* swarmer cells, a significant induction of the genes for iron metabolism was detected, which was higher at 0.6% agar than at 1.5% agar, indicating something unlike a mere decrease of iron

diffusion on solid surface as the signal to trigger induction (Wang *et al.*, 2004). These observations suggested an important role for iron in swarming, although no specific mechanism had been proposed so far. This work constitutes, to our knowledge, the first report directly relating pyoverdine-dependent iron acquisition with swarming.

Acknowledgements

M.A. Matilla and M.I. Ramos-González are recipients of grants from the Spanish Ministry of Education and Science (MEC), and the Junta de Andalucía respectively. Authors are undoubtedly thankful to J. de la Torre, for supplying mutants from the *Pseudomonas* Reference Culture Collection (<http://artemisa.eez.csic.es/prcc/>). This work was supported by grants to group CV191 from the Junta de Andalucía and BFU2006-09078/BMC to M.I.R.G. from MEC.

References

- Banin, E., Vasil, M.L., and Greenberg, E.P. (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 11076–11081.
- Belas, R., Goldman, M., and Ashlimar, K. (1995) Genetic analysis of *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell elongation. *J Bacteriol* **177**: 823–828.
- Bengoechea, J.A., Zhang, L., Toivanen, P., and Skurnik, M. (2002) Regulatory network of lipopolysaccharide O-antigen biosynthesis in *Yersinia enterocolitica* includes cell envelope-dependent signals. *Mol Microbiol* **44**: 1045–1062.
- Berg, H.C. (2005) Swarming motility: it better be wet. *Curr Biol* **15**: R599–R600.
- Bowden, M.G., and Kaplan, H.B. (1998) The *Myxococcus xanthus* lipopolysaccharide O-antigen is required for social motility and multicellular development. *Mol Microbiol* **30**: 275–284.
- Burrows, L.L. (2005) Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* **57**: 878–888.
- Caiazza, N.C., Shanks, R.M., and O'Toole, G.A. (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 7351–7361.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., and Michiels, J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**: 261–289.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S., and Villemur, R. (2003) *rhIA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**: 2005–2013.
- Espinosa-Urgel, M., and Ramos, J.L. (2004) Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Environ Microbiol* **70**: 5190–5198.
- Fraser, G.M., and Hughes, C. (1999) Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* **2**: 630–635.
- de Groot, A., Heijnen, I., de Cock, H., Filloux, A., and Tommassen, J. (1994) Characterization of type IV pilus genes in plant growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358. *J Bacteriol* **176**: 642–650.
- Harshey, R.M. (1994) Bees aren't the only ones: swarming in Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **13**: 389–394.
- Harshey, R.M. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**: 249–273.
- Hitchcock, P.J., and Brown, T.M. (1983) Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* **154**: 269–277.
- Junker, F., Rodríguez-Herva, J.J., Duque, E., Ramos-González, M.I., Llamas, M., and Ramos, J.L. (2001) A WbpL mutant of *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain, which lacks the O-antigenic side chain of lipopolysaccharides, is tolerant to organic solvent shocks. *Extremophiles* **5**: 93–99.
- Kearns, D.B., and Losick, R. (2003) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**: 581–590.
- King, E.O., Ward, M.K., and Rainey, D.E. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**: 301–307.
- Kinsinger, R.F., Shirk, M.C., and Fall, R. (2003) Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *J Bacteriol* **185**: 5627–5631.
- Koch, B., Jensen, L.E., and Nybroe, O. (2001) A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J Microbiol Methods* **45**: 187–195.
- Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., and Pechere, J.C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol* **182**: 5990–5996.
- Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, G.E., Thomas-Oates, J.E., *et al.* (2004) Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol* **51**: 97–113.
- Lai, H.C., Soo, P.C., Wei, J.R., Yi, W.C., Liaw, S.J., Horng, Y.T., *et al.* (2005) The RssAB two-component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids. *J Bacteriol* **187**: 3407–3414.
- Lam, J.S., Mawish, M., and Poon, K.K.H. (2004) Lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas*, Vol. 3. Ramos, J.L. (ed.). New York, NY, USA: Kluwer Academic, pp. 3–51.
- Lamont, I.L., Beare, P.A., Ochsner, U., Vasil, A.I., and Vasil, M.L. (2002) Siderophore-mediated signaling regulates virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 7072–7077.
- McCarter, L., and Silverman, M. (1989) Iron regulation of swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **171**: 731–736.
- McGroarty, E.J., and Rivera, M. (1990) Growth-dependent alterations in production of serotype-specific and common antigen lipopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infect Immun* **58**: 1030–1037.
- Matsuyama, T., Bhasin, A., and Harshey, R.M. (1995) Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading

1850 M. A. Matilla et al.

- of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J Bacteriol* **177**: 987–991.
- Mattick, J.S. (2002) Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* **56**: 289–314.
- Molina, L.A., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M.C., García, J.M., Wyke, L., and Ramos, J.L. (2000) Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biol Biochem* **32**: 315–321.
- Nakazawa, T. (2002) Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ Microbiol* **4**: 782–786.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A., et al. (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799–808.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449–461.
- Raaijmakers, J.M., Bitter, W., Punte, H.L., Bakker, P.A., Weisbeek, P.J., and Schippers, B. (1994) Siderophore receptor PupA as a marker to monitor wild-type *Pseudomonas putida* WCS358 in natural environments. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1184–1190.
- Ramos-González, M.I. (1993) Generation of monoclonal antibodies against *Pseudomonas putida* harboring recombinant DNA: cloning and sequencing of genes encoding surface antigens. *PhD Thesis*. Granada, Spain: University of Granada.
- Ramos-González, M.I., Ruiz-Cabello, F., Brettar, I., Garrido, F., and Ramos, J.L. (1992) Tracking genetically engineered bacteria: monoclonal antibodies against surface determinants of the soil bacterium *Pseudomonas putida* 2440. *J Bacteriol* **174**: 2978–2985.
- Ramos-González, M.I., Campos, M.J., and Ramos, J.L. (2005) Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: *in vivo* expression technology capture and identification of root-activated promoters. *J Bacteriol* **187**: 4033–4041.
- Rashid, M.H., and Kornberg, A. (2000) Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4885–4890.
- Ravel, J., and Cornelis, P. (2003) Genomics of pyoverdine-mediated iron uptake in pseudomonads. *Trends Microbiol* **11**: 195–200.
- Regenhardt, D., Heuer, H., Heim, S., Fernandez, D.U., Strömpl, C., Moore, E.R.B., and Timmis, K.N. (2002) Pedigree and taxonomic credentials of *Pseudomonas putida* strain KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 912–915.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sauer, K., and Camper, A.K. (2001) Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol* **183**: 6579–6589.
- Semmler, A.B., Whitchurch, C.B., and Mattick, J.S. (1999) A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **145**: 2863–2873.
- Shin, S.H., Lim, Y., Lee, S.E., Yang, N.W., and Rhee, J.H. (2001) CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. *J Microbiol Methods* **44**: 89–95.
- Singh, P.K., Parsek, M.R., Greenberg, E.P., and Welsh, M.J. (2002) A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* **417**: 552–555.
- Skerker, J.M., and Berg, H.C. (2001) Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6901–6904.
- Smith, E.E., Sims, E.H., Spencer, D.H., Kaul, R., and Olson, M.V. (2005) Evidence for diversifying selection at the pyoverdine locus of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 2138–2147.
- Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N., and Napoli, C. (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *J Bacteriol* **169**: 5789–5794.
- Toguchi, A., Siano, M., Burkart, M., and Harshey, R.M. (2000) Genetics of swarming motility in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: critical role for lipopolysaccharide. *J Bacteriol* **182**: 6308–6321.
- Toutain, C.M., Zegans, M.E., and O'Toole, G.A. (2005) Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**: 771–777.
- Visca, P., Imperi, F., and Lamont, I.L. (2007) Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance. *Trends Microbiol* **15**: 22–30.
- 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. *Mol Microbiol* **52**: 169–187.

Supplementary material

The following supplementary material is available for this article online:

Movie S1. KTR. *En masse* movement of strain KT2440R on PG-agar (0.5%), 18 h after inoculation on the centre of a Petri dish. One image (×400) was taken per second during 14 min.

Movie S2. FLGK. Surface spreading of the flagella mutant *flgK* on PG-agar (0.5%), 18 h after inoculation on the centre of a Petri dish. One image (×200) was taken per second during 17 min.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>

CAPÍTULO 4

Caracterización del único regulador de respuesta GGDEF/EAL en *Pseudomonas putida* KT2440: desde el control de la expresión génica a las dianas moleculares

Autores: Miguel A. Matilla, Juan L. Ramos, María L. Travieso y María Isabel Ramos-González.

Los dominios enzimáticos GGDEF y EAL/HD-GYP están implicados en la síntesis y degradación del segundo mensajero en bacterias diguanilato cíclico (di-GMPc) debido a su actividad diguanilato ciclasa (DGC) y fosfodiesterasa (PDE), respectivamente. El genoma de *Pseudomonas putida* KT2440 presenta cuarenta y tres genes que codifican proteínas hipotéticamente implicadas en el metabolismo de esta molécula señal intracelular. Entre ellos, *rup4959*, cuyo promotor está activo en la rizosfera, codifica el único regulador de respuesta dual GGDEF/EAL de KT2440. La transcripción de este gen es dependiente del factor sigma alternativo σ^{38} y, a su vez, está modulada por el regulador global ANR y la tensión parcial de oxígeno de manera independiente. *rup4959* es el primer gen de un clúster compuesto por los loci PP4957-4959 que forman parte de la misma unidad transcripcional. La inactivación de *rup4959* disminuye ligeramente la formación de biopelículas en superficies abióticas en condiciones estáticas. Cuando este gen se sobreexpresa o se encuentra en multicopia se induce la aparición de un fenotipo pleiotrópico característico de unos niveles elevados de di-GMPc (sobreproducción de exopolisacáridos [EPS] que unen calcoflúor, incremento en la síntesis de "biofilms" en superficies abióticas o en la interfase líquido aire y una morfología de colonia rugosa). Mediante un análisis HPLC-MS se ha puesto de manifiesto que *rup4959* en multicopia incrementa "in vivo" los niveles intracelulares del segundo mensajero como una clara evidencia de que Rup4959 presenta actividad DGC. Mediante la utilización de microarrays se han observado cambios menores en el perfil de expresión génica entre una cepa silvestre KT2440 y otra mutante *rup4959*. En cambio, el mismo análisis genómico en la rizosfera ha permitido identificar veintidós genes con expresión diferencial en este hábitat, la mayoría de ellos con función desconocida. El estudio de una batería de mutantes en dianas hipotéticas de di-GMPc permitió identificar a un EPS específico de *P. putida*, distinto a la celulosa y el alginato, como el polisacárido que se sobreproduce cuando *rup4959* está en multicopia, y asignó un papel a los lipopolisacáridos, tanto al "core" como al antígeno O, en la aparición de una morfología de colonia rugosa.

Manuscrito en preparación

**Characterization of the unique GGDEF/EAL response regulator in the
beneficial bacteria *P. putida* KT2440: from the control of gene
expression to target processes**

*Miguel A. Matilla, Juan L. Ramos, María L. Travieso, and María Isabel
Ramos-González*.*

¹ Department of Environmental Protection, Estación Experimental del
Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Profesor
Albareda 1, Granada 18008, Spain.

* Corresponding author

Phone:(34) 958 181600 Local 116

Fax: (34) 958 129600

e-mail: maribel.ramos@eez.csic.es

SUMMARY

GGDEF and EAL/HD-GYP domains are responsible for the synthesis and hydrolysis of the bacterial secondary messenger cyclic diguanylate (c-diGMP) through their enzymatic activities diguanylate cyclase (DGC) and phosphodiesterase (PDE), respectively. Forty three genes in *Pseudomonas putida* KT2440 encodes peptides hypothetically involved in the metabolism of this intracellular signaling molecule. Of them only *rup4959*, whose promoter is active in the rhizosphere, encodes a dual GGDEF/EAL response regulator (RR). *rup4959* expression is strictly dependent on the alternative transcriptional factor σ^{38} , and is modulated by oxygen and ANR albeit independently. Inactivation of *rup4959* (locus PP4959) had a slight effect upon biofilm formation under static conditions. In multicopy or overexpressed, this gene is responsible for a pleiotropic phenotype characteristic of high levels of c-diGMP (increased calcofluor stainable exopolysaccharides [EPS], enhanced biofilm formation on surface or in the liquid/air interphase, and development of wrinkly colony morphology). HPLC-MS analysis confirmed that this phenotype correlated with an increase in the global level of c-diGMP as strong evidence of Rup4959 to exhibit DGC activity. Minor changes in gene expression pattern in microarrays were observed in the stationary phase of growth between the wild type and *rup4959* strains. The same analysis performed in the rhizosphere identified 22 genes with altered expression, a big group encoding proteins of unknown function. A screening with mutants in putative targets of c-diGMP allowed identifying an uncharacterized polysaccharide specific of KT2440 as essential for the acquisition of the altered phenotype with *rup4959* in multicopy. Using the same strategy, cellulose and alginate were discarded as the overproduced EPS, and LPS core and O-antigen were unveiled to be essential for the development of wrinkly colony morphology.

INTRODUCTION

Bacterial fitness in the rhizosphere is a necessary condition to achieve successful biocontrol (Chin-A-Woeng *et al.*, 2000; Matilla *et al.*, 2010 in press). A variety of colonization traits of *Pseudomonas* have been identified using several approaches (Lugtenberg *et al.*, 2001; Mark *et al.*, 2005; Ramos-González *et al.*, 2005; Silby *et al.*, 2009). However, it has not been until recently that a genome wide study has considered one of the distinctive features of bacterial life in the rhizosphere, i.e. sessility (Matilla *et al.*, 2007). This study comprising a global transcriptomic analysis of *P. putida* KT2440 in the rhizosphere of maize plants revealed the preferential expression of *rup4959* (root up-regulated) during colonization. This gene encodes a dual GGDEF/EAL protein containing a REC domain and stands for the sole response regulator with these output domains in KT2440. Profuse investigations performed in this decade have demonstrated these enzymatic domains to be responsible for inversely regulating intracellular levels of the second messenger bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP). This second messenger is synthesized by action of the diguanilate cyclase (DGC) activity present in intact GGDEF domains, and hydrolyzed by specific phosphodiesterase (PDE) activity that resides on intact EAL, and HD-GYP domains. The genome of KT2440 contains 43 genes related with c-di-GMP turn-over (Galperin, 2005; Ulrich and Zhulin 2007). The abundance of proteins containing one or both of the GGDEF and EAL domains in a single strain, mainly proteobacteria, is a common issue (Galperin, 2005). Although to our better knowledge metabolism of c-di-GMP has not been studied in any *Pseudomonas putida* strain, evidences from related bacteria seem to indicate that a reduced number of these proteins has an effect upon total c-di-GMP when overexpressed (Kulasakara *et al.*, 2006). Exceptionally, the individual contribution of a protein at physiological doses to the intracellular c-di-GMP is known. Proteins which reduce the global level of the second messenger at least in 50% are BifA from *P. aeruginosa* (Kuchma *et al.*, 2007), AdrA from *Salmonella enterica* (Kader *et al.*, 2006) and CC3396 from *Caulobacter crescentus* (Christen *et al.*, 2005). Moreover constitutive phosphorylation of the DGC WspR, caused by the inactivation of WspF, altered the transcription of more than 500 genes in *P. aeruginosa*

(Hickman *et al.*, 2005). In addition, overexpression of proteins with DGC activity also has an effect upon total c-di-GMP and changes in the global expression pattern have been observed under so achieved artificially increased c-di-GMP levels (Beyhan *et al.*, 2006; Méndez-Ortiz *et al.*, 2006). This second messenger can affect the expression of target genes through its direct binding with a transcriptional regulator. An example is FleQ, whose binding with c-di-GMP antagonizes the activity of the second messenger as repressor (Hickman and Harwood, 2008). Besides a c-di-GMP binding riboswitch controlling translational initiation has been identified (Sudarsan *et al.*, 2008).

GGDEF/EAL output domains are often part of peptides with multidomain structure and it is common that N-terminal domains sense internal and environmental signals, thus implicating GGDEF and EAL proteins in signal transduction. Three response regulators in KT2440 have a GGDEF domain (Galperin, 2006; Ulrich and Zhuli, 2007). Of them only locus PP4959 has also an EAL domain presenting the *P. aeruginosa* FimX-like REC-PAS-GGDEF-EAL architecture. FimX was initially described as a PDE controlling twitching motility (Kazmierczak *et al.*, 2006) and more recently, as a consequence of its low enzymatic activity, it has been reclassified as inactive (Rao *et al.*, 2008). However, its functionality is independent on catalytic activity, which is in accordance with its degenerated GGDEF and EAL domains (Navarro *et al.*, 2009). The other dual response regulator GGDEF/EAL that to our knowledge has been characterized is RavR from *Xanthomonas campestris* and exhibits PDE activity (He *et al.*, 2009).

C-di-GMP regulates different cellular processes achieving the transition from planktonic life style to sessility. Among them are intercellular signalling (Hengge, 2009; Römling and Simm, 2009), motility (Wolfe and Visick, 2008), biosynthesis of exopolysaccharides (EPS) (Tamayo *et al.*, 2007), wrinkly morphology (Nakhmchik *et al.*, 2008), and biofilm formation (Jonas *et al.*, 2009). Thus the production of cellulose (García *et al.*, 2004) or cellulosic polymers (Spiers *et al.*, 2003), alginate (Hay *et al.*, 2009) and others EPS (Hickman *et al.*, 2005) has been shown to be dependent on proteins with GGDEF/EAL domains. More recently, it has been demonstrated that the synthesis of cellulose was the only phenotype dependent strictly on c-di-GMP, in *Salmonella typhimurium* (Solano *et al.*, 2009). An increase in

this second messenger diminishes virulence in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, as it has been reported after the inactivation of the HD-GYP protein RpfG (Ryan *et al.*, 2007). Whether this second messenger might affect the beneficial plant-bacteria interaction is currently unknown.

In this study we investigated the regulation of the gene cluster *rup4959-4957*, the effects of the dual GGDEF/EAL response regulator Rup4959 upon the cellular c-di-GMP pool, as well as upon motility, exopolysaccharides production, biofilm formation and rhizosphere colonization. Consistent with the results observed in a previous genomic analysis (Matilla *et al.*, 2007), the *rup* promoter was found to be active during colonization of the rhizosphere. We present biochemical and genetic evidence that when overexpressed Rup4959 has DGC activity "in vivo". As part of the characterization of the signalling transduction pathway involving Rup4959, LPS and certain uncharacterized EPS were essential in order for *P. putida* to acquire a pleiotropic phenotype under high levels of the second messenger.

RESULTS AND DISCUSSION

***P_{rup4959}* is active in the rhizosphere and maize root-exudates (RE) induce the initiation of *rup4959* transcription**

To monitor the activity of *rup4959* promoter *in situ* in the rhizosphere of *Zea mays*, a transcriptional fusion of $P_{rup4959}$ to the promoterless gene encoding the stable red fluorescent protein ('*dsred*') was generated. Figure 1 shows *P. putida* KT2440 (Table 1) hosting this fusion in the plasmid pMIR149 (Table 2), which was active while colonizing the maize root.

β -galactosidase activity from $P_{rup4959}::' *lacZ* fusion in plasmid pMAMV12 was assessed along the growth curve in KT2440 both in rich medium and defined M9 minimal medium supplied with different C sources. This fusion included the first three nucleotides of the *rup4959* gene in frame with '*lacZ*', so that any regulation operating on the non-translated RNA leader is active. However, the Shine-Dalgarno and the ATG of the chloramphenicol acetyltransferase (Cat) present in pMP220 were also kept in the fusion. This start codon was in frame with the ATG of *rup4959*. The promoter of *rup4959* was active in all media tested as bacteria entered into the stationary phase of growth (Fig. 2), although the level of activity after 24 h$

of growth differed considerably between 12,850 and 3,249 MU, being the highest in benzoate, followed by LB, glucose and the lowest in citrate. To examine whether the induction observed for *rup4959* in microarrays during rhizosphere colonization (Matilla *et al.*, 2007) was in part due to the RE, they were added to a log culture in M9-citrate, conditions to which the activity of the promoter was the lowest. After 5 h of growth in the presence of RE an induction of at least 7 fold was observed as the culture reached the stationary phase (Fig. 3A). Induction was also observed, although at lower level, about 4 fold, when the exudates were added at the beginning of the stationary phase ($OD_{600nm} = 2$) and β -gal activity was measured after 2 h (Fig. 3B). It is worth noting that in a similar experiment, 1 mM of benzoate induced 1.8 ± 0.23 fold the transcription of *rup4959* whereas the non-metabolizable acyl derivative 3-methylbenzoate did not have any effect (not shown). In an attempt to identify the inducing compound in the maize exudates, four benzoxazinone derivatives such as 2,4-dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIBOA), dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA), 2-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (HBOA) and 2-hydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (HMBOA), which constitute more than 90% of the organic exudates in Gramineae (Zhang *et al.*, 2000), were assayed in a concentration range of 0.1-0.5 mM. None of them showed any inducing effect upon transcription and DIMBOA even slightly had a negative effect upon transcription (not shown). No induction was observed with RE from 18-day old *Arabidopsis thaliana*.

***rup4959* requires the alternative transcription initiation factor σ^{38} for expression.**

In all conditions assayed, transcription from $P_{rup4959}$ started as cultures reached the early stationary phase of growth (OD_{600nm} in LB > 2.7), suggesting that *rup4959* expression was likely dependent on the general stress sigma factor RpoS (σ^S or σ^{38}) (reviewed by Klauck *et al.*, 2007; Venturi, 2003). To test this possibility, activity of the $P_{rup4959}::lacZ$ fusion in plasmid pMAMV12 was measured in the *rpoS* mutant strain C1R1 (Ramos-González and Molin, 1998) and compared with the wild type KT2440. As it is shown in figure 4, *rup4959* transcription was entirely dependent on σ^S in *P.*

putida and this transcription factor was likewise required for the induction observed with exudates (not shown). In *E. coli* MC4100, β -gal activity measured from pMAMV12 was 5-fold higher (52.2 ± 9.2 MU) than that from the control plasmid pMP220 (9.6 ± 0.3 MU) after 24 h of growth. The low activity measured in this strain, which has a wild type *rpoS* allele (Lange and Hengge-Aronis, 1991), in comparison with the high activity observed in *P. putida* suggests the need for specific *Pseudomonas* factor/s in the initiation of *rup4959* transcription that is/are absent in *E. coli*. Alternatively, a repressor in *E. coli* might act inhibiting the transcription.

In *E. coli*, the *rpoS* expression is regulated at transcriptional and posttranscriptional level (Klauck *et al.*, 2007). In *P. putida*, it is known that the *rpoS* 5' untranslated region has a role in its translational control (Jovcic *et al.*, 2008). By using a translational fusion of the *rpoS* promoter containing its 5' untranslated region, the ATG and the next 42 nucleotides in frame with *'lacZ* in plasmid pMAMV21, a modest 1.6 ± 0.17 fold induction of the β -gal activity by RE was observed (Fig. 3C). This constitutes an indication that the effect of RE upon the *rup4959* transcription (Fig. 3A, B) was at least in part a consequence of the regulation effective upon *rpoS* itself.

Microaerobiosis induces transcription of *rup4959* and *rpoS*

Microaerobic or even anaerobic conditions can be generated in the rhizosphere because of elevated levels of O₂ consumption by the root and microbial respiration, and also by abiotic conditions such as flooding (Brimecombe *et al.*, 2007). KT2440 is a strictly aerobic bacterium although it can efficiently perform in a microaerobic environment (Ugidos *et al.*, 2008). To investigate whether the *rup4959* transcription was regulated by oxygen depletion, atmospheric air was mixed with N₂ to achieve a declining in the oxygen tension from 20.95% down to 5.34%. As oxygen concentration was going down, an increase in the transcription was observed, with a maximum induction of 2.5-fold corresponding to O₂ approximately half to that in atmospheric air (Fig. 5). This induction was not due to cessation of growth since turbidity at the end of the experiment was similar in all samples (OD_{600nm} = 2.2), except for that at the lowest oxygen

tension evaluated, which exhibited a significant reduction in the final turbidity ($OD_{600nm} = 1.5$). As an indirect method to assess the effect of aeration upon the fusion $P_{rup4959}::lacZ$, the volume of the container and/or the inclination angle with respect to the horizontal plane were considered. To a lesser volume and therefore less air capacity corresponded higher promoter activity as expected (not shown). Similar effect, although more prominent, was observed by increasing the inclination angle of a culture tube with respect to the horizontal plane (α), which also reduced aeration (Fig. 6A). Between two extremes situations up to 14-fold higher β -gal activity was measured in tubes (150 x 20 mm) with low aeration ($\alpha = 60^\circ$) than in 500 mL flasks under vigorous shaking (200 rpm) (not shown). However, differences were not observed in qRT-PCR (not shown) suggesting that posttranscriptional control might be acting upon the *rup4959* expression.

Similarly to the observed with RE, we found that *rpoS* expression in pMAMV21 was also increased in response to low aeration (Fig. 6B). To assess whether this fact was common to others genes in the RpoS regulon, the activity of *cfab* promoter, known to be regulated by this transcription factor, was measured under two levels of aeration. *cfab* which codes for a cyclopropane synthase (Pini *et al.*, 2009) showed similar regulation to *rpoS* (Fig. 6C). This strongly suggests that the induction of *rup4959* transcription in microaerobiosis is influenced by the RpoS levels.

ANR is not responsible for the induction of *rup4959* transcription in microaerobiosis.

The *Pseudomonas* ANR global regulator is homologous to the *E. coli* FNR (Zimmermann *et al.*, 1991) and plays an important role in the adaptation to oxygen limitation conditions (Galimand *et al.*, 1991). FNR responds activating or repressing the expression of a network of genes required for the cell adaptation to anaerobic conditions (Grainger *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2005; Salmon *et al.*, 2003). We investigated a potential role of ANR in the activation of *rup4959* transcription as observed in microaerobiosis (Fig. 6) with a *P. putida* Δanr mutant. β -galactosidase activity measured from $P_{rup4959}::lacZ$ in Δanr was about half of that in the wt during growth in LB

(Fig. 7), although no difference in activity beyond this was observed in this medium under low aeration conditions (not shown). No further differences in the transcription activity, compared to the wt, were observed in the mutant in citrate-supplied M9 medium under different aeration conditions (not shown). This is an indication that ANR, although controls the activity of the promoter, however it is not involved in the induction observed in microaerobiosis.

Mapping of *rup4959* transcription initiation sites.

The sites for the transcription initiation of *rup4959* were determined by primer extension analysis (Fig. 8). One cDNA band corresponding to a messenger initiated in the G (G_1) located 104 nucleotides upstream of the A of the proposed ATG and a double band corresponding to messengers initiated in pair GG (G_2 and G_3) located 45 and 44 nucleotides upstream of this ATG, respectively, became visible in the wt strain. They exhibited an increased intensity signal when *rup4959* was expressed from its own promoter in multicopy in KT2440 (pMAMV1) (Fig. 8A). These three bands were absent in C1R1 indicating that the initiation of transcription at these positions is RpoS dependent. Each transcription initiation site identified in *rup4959* presents a -10 sequence highly conserved as compared with the -10 consensus sequence (TAC/TACT) for σ^S -dependent promoters (Becker and Hengge-Aronis, 2001; Espinosa-Urgel *et al.*, 1996; Lee and Gralla, 2001) and also an extended -10 site (T/GC) proposed for the recognition by the RNA polymerase holoenzyme $E\sigma^S$ (Becker and Hengge-Aronis, 2001) (Fig. 8B). These three transcription initiation sites also showed AT rich sequences downstream of the extended -10 element, which promote σ^S specificity (Becker and Hengge-Aronis, 2001; Lee and Gralla, 2001; Typas *et al.*, 2007). Low conservation of the consensus proposed for the -35 $E\sigma^S$ binding (TTGACA) (Gaal *et al.*, 2001; Typas *et al.*, 2007) was observed albeit degeneration of this sequence and size variability of the spacing region between -35 and -10 binding sites are common features of σ^S -dependent promoters. Even though the grade of conservation is low, a putative -35 sequence for each of the transcription initiation points G_1 , G_2 and G_3 is proposed (Fig. 8B), containing the optimal TT nucleotides in the

5' terminal end for the σ^S recognition (Gaal *et al.*, 2001). It is shown in figure 8B that a region containing the translation initiation codon of *rup4959* matches the consensus for the global posttranscriptional regulator CsrA (Dubey *et al.*, 2005). Control of the gene expression at this level might explain the contradictory results obtained with β -galactosidase activity as measured from pMAMV12 (Fig. 6), which evaluates initiation of the transcription, and those data generated with qRT-PCR, which estimates mRNA levels, under microaeration. Attempts to analyze the promoter activity of the fragment containing G₂ and G₃ and its upstream region, deprived of G₁ and further upstream region, resulted in genetic reorganizations and/or deletions making this analysis unfeasible. The sequence at the initiation of transcription G₂ also matches the consensus of CsrA (Fig. 8B), although with lower similarity than that at the start ATG of the gene *rup4959*.

Features derived of the sequence analysis of cluster *rup4959-4957* and its genetic organization in *Pseudomonas*.

We identified two loci downstream from *rup4959* in the minus strand, PP4958 and PP4957. A scheme with the gene organization including intergenic distances is shown in the figure 9. By performing RT-PCR it was confirmed that *rup4959* is cotranscribed with the other two genes (not shown).

Locus PP4958 and PP4957 encode hypothetical proteins of 179 and 98 amino acids length, respectively. *Rup4959* encodes a multidomain response regulator (RR) of 708 amino acids length (Fig. 9). Besides of the RR receiver domain (REC) located in the amino terminus of the protein, it presents a PAS stimuli recognition domain and the output domains with enzymatic activity GGDEF/EAL (Finn *et al.*, 2008) (Fig. 9). The REC domain is commonly found in response regulators of two component phosphorelay signal transduction systems. The fusion of this input domain to output domains allow the bacteria to regulate cellular processes like transcription, enzymatic activities and protein-protein interaction in response to environmental challenges (Galperin, 2006). *rup4959* shows an orphan gene organization since it does not have any flanking histidine kinase protein

(Nelson *et al.*, 2002), what makes difficult assign it a specific kinase. The genome of *P. putida* KT2440 encodes three RR with GGDEF domain (Ulrich and Zhulin, 2007) but Rup4959 is the unique with both GGDEF/EAL domains.

Blast analyses of Rup4959 against the NCBI sequence database revealed high similarity to proteins from other *P. putida* strains such as Pput4832 (98%), from *P. putida* F1, or PputGB15008 (97%), from *P. putida* GB-1. Orthologs to Rup4959 are also present in some species of the genus *Pseudomonas* such as *P. entomophila* L48 (91%), *P. fluorescens* Pf-5 (82%), *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (79%), *P. mendocina* ymp (73%), and *P. stutzeri* A1501 (71%), but this protein is absent from bacteria other than *Pseudomonas*. Genes encoding PP4958 and PP4957 are also conserved in other strains of *P. putida*. Same gene organization as in *P. putida* is present in *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 and *P. fluorescens* Pf-5, and PfO-1. Exceptionally in *P. syringae* pv. *phaseolicola* this gene cluster is also present but the gene homologous to that encoding PP4957 is convergently transcribed to the other two. A special case was found for the opportunistic pathogen *P. aeruginosa*, which does not have *rup4959* homologous but homologues to genes encoding PP4957 and PP4958 are scattered in its genome.

Phenotypic characterization of mutants in the *rup4959-4957* operon.

Three Km resistant mutants in each of the genes of the operon, apolar upon downstream genes, and a double mutant in loci PP4958 and PP4957 were generated. Besides two Rup4959 mutants (Ω Tc and Ω Km) polar upon downstream genes encoding PP4958 and PP4957 were also generated as described in the Experimental Procedures section. Figure 9 shows a scheme with all the mutants generated. Apolar Rup4959Km mutant has a deletion that extends from residue 2 to 681 of the protein. Rup4959 Ω Tc and Rup4959 Ω Km have a deletion that extends from residue 166 to residue 681. The double mutant has a deletion from residue 99 in PP4958 to 16 in PP4957. All the Km resistant mutants were indistinguishable to the wt for their growth in LB and in defined M9 supplied with glucose, citrate or benzoate as carbon sources (not shown). However, the Rup4959 Ω Tc

mutant exhibited a delayed growth in citrate in the presence of Tc that was not observed in the absence of the antibiotic. The lack of phenotype in this condition was not due to the loss of the Ω Tc insertion from the chromosome. For a further analysis of the role of *rup4959-4957* upon Tc resistance, plasmid pGB1, conferring Tc resistance, was introduced into the wt and all the Km mutants. No differences in growth were observed in the range of 1-10 mM Tc among the strains carrying this plasmid, likely as a consequence of having Tc resistance gene in multicopy. All the Km resistant mutants were unaffected in their capacity to cope with plants in all the experiments performed, i.e. adhesion to corn seeds, rhizosphere colonization of maize and Arabidopsis plants and efficiency in competitive colonization with the wt. No differences in EPS as revealed with calcofluor tinctin, motility or colony morphology were detected (not shown). Rup4959 Ω Km mutant was slightly retarded, approximately 1 h, on its ability to form biofilm in dynamic liquid cultures compared with the wt (not shown). A most hampered phenotype was observed in static cultures (Fig. 10A, B) in accordance to the activation of the transcription observed previously for *rup4959* under microaeration (Fig. 5).

Transcriptional analyses of KT2440 vs. Rup4959 Ω Tc mutant strain *in vitro* and in the rhizosphere.

To identify genes whose transcription is under direct or indirect regulation by Rup4959 and eventually c-di-GMP levels, under physiological levels, a whole-genome transcriptional analysis with the wt and the Rup4959 Ω Tc mutant has been performed. We chose this mutant because it was more affected in its phenotype than the others (see above). This analysis included two different conditions in which $P_{rup4959}$ is active, i.e. stationary phase of growth in LB and the rhizosphere of the maize plants where $P_{rup4959}$ is active (Fig. 1 and 2). The genomic analysis in LB medium did not exhibit significant changes (with at least 1.7-fold differences and P -value < 0.05) except for the induction in the mutant of an oxidoreductase (PP3208) and the repression of two genes encoding a hypothetical protein (PP4047) and an efflux transporter (PP1516), which may apparently be involved in protein secretion of a multidrug resistance protein encoded by

PP1517. Similarly to our results, obtained under physiological levels of c-di-GMP, it has been observed that an *E. coli* mutant in the DGC YddV exhibits changes in a reduced number of genes (Weber *et al.*, 2006). This work did not confirm the altered expression in numerous genes observed as this DGC was overproduced and total c-di-GMP increased up to levels that are not physiological (Méndez-Ortiz *et al.*, 2006). However, not every mutation in GGDEF/EAL protein seems to have a minor or specific effect upon global gene expression. Changes in gene expression of more than 500 genes have been reported as a consequence of the inactivation of the PDE WspF in *P. aeruginosa*, which is part of a putative chemosensory signal-transduction operon (Hickman *et al.*, 2005). Likely environmental conditions affecting gene expression, contribution of a specific protein to the global pool of c-di-GMP in the cell and micro-compartmentalization of associations of proteins and c-di-GMP may be sources for the heterogeneity observed. As an evidence that environment indeed affects, our transcriptomic analysis in the rhizosphere revealed 22 differentially expressed genes, 8 genes up-regulated and 14 down-regulated in the Rup4959 Ω Tc mutant in comparison with the wild type (Table 3). Higher than 50% of the differentially expressed genes encoded hypothetical proteins and proteins of unknown function. Genes involved in regulatory processes, transport, metabolism of aromatic compounds, resistance to stress and nucleic acids processing were also identified.

i) Down regulated genes

Genes with metabolic functions such as *benC*, which is involved in the catabolism of benzoate (*benABC*) (Cowles *et al.*, 2000), were found to be repressed in the Rup4959 Ω Tc mutant. We also observed altered expression in *hyuB* encoding a subunit of the hydantoinase, an enzyme for the metabolism of hydantoin. This compound has been found in sugar beet plants (Ware, 1950) and it is the result of a double condensation between urea and glycolic acid that microorganisms can use as carbon and nitrogen source (Matcher *et al.*, 2004). It is also important to emphasize those loci with function in secretion and transport, i.e. PP1516, which was also repressed in the Rup4959 Ω Tc mutant growing in LB medium, and a component of the XcpV secretion apparatus (Nunn and Lory, 1993).

ii) Up regulated genes

Most of the genes induced in the Rup4959 Ω Tc mutant codes for unknown function proteins some of which are unique in KT2440 i.e. PP3685 and PP3901. A gene encoding a permease of an ABC-type peptide transport system (PP4149) showed the maximum expression change. This locus is integrated in a cluster. Mutational analysis in an orthologous cluster coding for peptide transport systems in *Helicobacter pylori* has demonstrated its role in di- and short oligo-peptides transport (Weinberg and Maier, 2007).

Role of Rup4959 upon peptide transport

To investigate the involvement of Rup4959 on peptide transport, we followed the ability of the wt and mutants in the *rup4959-4957* gene cluster to grow with dipeptides or tripeptides as the sole nitrogen source in glucose-supplied M8 minimal medium. A total of 19 dipeptides and 8 tripeptides were tested. Rup4959 Ω Km mutant showed a delay of at least 11 h to reach OD_{420-580nm} = 0.8 in the presence of dipeptide Gly-Pro (Fig. 11A) and tripeptides Gly-Gly-Ala (Fig. 11B), or Gly-Gly-Leu (Fig. 11C), whereas single mutants in genes encoding PP4958 and PP4957 showed a shorter delay (Fig. 11). No significant differences in growth were observed with other peptides, including Gly-Gly (not shown). These results suggest a role of the *rup4959-4957* gene cluster in the transport/utilization as nitrogen source of glycine-containing tripeptides.

Phenotypic characterization of *P. putida* KT2440 with *rup4959* in multicopy

The phenotype conferred by *rup4959* in multicopy was investigated by using plasmids pMAMV1, containing *rup4959* expressed from its own σ^{38} dependent promoter, and pMIR155, with the *rup4959* expression conditioned to the presence of arabinose and so independent on the growth phase. The capacity of forming biofilm was enhanced in KT2440 (pMAMV1) along the growth curve, in comparison to this strain bearing the control plasmid pBBR1MCS-5. Moreover, the biofilm was not restricted to the air-liquid interphase (Fig. 12A) and was robust even at the stationary phase of growth, when it usually detaches in KT2440 (Fig. 12B). The presence of the

plasmid pMAMV1 also caused pellicles formation on the air-liquid interphase of those cultures that reached elevated cellular density ($OD_{600} > 4.9$) such as in LB and M9-glucose medium (not shown). In M9-citrate ($OD_{600} < 2.9$) or M9-benzoate media ($OD_{600} < 2$) pellicles were not developed (not shown). This pellicle formation was highly increased in M9-glucose medium with the addition of CAA (Fig. 12C). An increase in the production of calcofluor white staining exopolysaccharides (EPS) was also observed in KT2440 (pMAMV1) (Fig. 12D). The synthesis of EPS has been correlated in *P. aeruginosa* with three autoaggregative phenotypes namely wrinkled colonies, pellicles, and solid-surface-associated biofilms (Friedman and Kolter, 2004; Lim *et al.*, 2006) that was also observed in this *P. putida* (Fig. 12). Similarly to the development of bacterial pellicles, cellular clumping was only observed in those media where cultures reached high cellular density. All these phenotypes, which are consistent with accumulation of high levels of c-di-GMP (reviewed in Hengge, 2009; Römling and Amikan, 2006) were observed when *rup4959* was expressed under the control of the arabinose inducible promoter in pMIR155. When arabinose was added to a culture of KT2440 (pMIR155) at early stage of growth, interestingly, earlier appearance of phenotypes derived from high levels of c-di-GMPc such as forming of clumps/pellicles was not observed. Several alternative explanations to this observation exist that are not mutually exclusive: i) posttranscriptional regulation upon *rup4959* applies and the protein is not active in earlier states, ii) one or more targets in the signalling pathway are not expressed until cells reach the stationary phase, and iii) a cell density signal molecule is required in this pathway.

To characterize motility with *rup4959* in multicopy, KT2440 (pMIR155) was used in order to have *rup4959* expressed independently of the growth phase. Swarming was totally inhibited as compared with the strain carrying the corresponding control plasmid pMBTB-2 (Fig. 13A), and the colony turned sticky, probably because of an increased EPS production. Swimming ability was partially reduced (24%) in relation to the control (Fig. 13B). It is worth mentioning that KT2440 (pMAMV1) could not colonize root apex likely due to its diminished motility (not shown), in accordance to motile ability being essential for bacteria to reach the root tip (Capdevilla *et al.*, 2004; Dekkers *et al.*, 1998).

rup4959* in multicopy confers diguanylate cyclase (DGC) activity *in vivo

All the phenotypes related with *rup4959* either in multicopy in pMAMV1 or overexpressed in pMIR155 suggested a DGC activity of GGDEF domain “*in vivo*” and so increasing levels of c-di-GMP inside the cells. To investigate the role of *rup4959* in the metabolism of c-di-GMP *in vivo*, nucleotides from bacterial cells in the early stationary phase from the wt, mutant with the gene inactive or bearing the gene in multicopy were extracted and analyzed by HPLC-MS. Remarkably, c-di-GMP was undetectable both in wt and apolar mutant Rup4959Km strains, and its concentration was 804 pmol mg⁻¹ wet weight in KT2440 (pMAMV1) (Fig. 14). This result indicated that Rup4959 does not contribute significantly to the global pool of c-di-GMP in the cell or, alternatively, its contribution is below the detection levels. Although it is demonstrated that the GGDEF domain is active under the conditions assayed, however the possibility of an also active EAL domain could not be discarded.

Is KT2440 autoaggregation dependent on a stationary phase signal?

The formation of big clumps observed in liquid cultures of KT2440 (pMAMV1) could be assessed by a decrease in the optical density at the stationary phase of growth as result of flocculation. Under the microscope, these clumps had the appearance of cells imbibed in an extracellular matrix (not shown). Even when *rup4959* expression was L-arabinose conditioned and RpoS independent, in pMIR155, clumps could not be observed until the cultures reached the stationary phase of growth (Fig. 15A). Interestingly, the addition of cell-free supernatants from late stationary phase KT2440 cultures to KT2440 (pMIR155) at the early stage of growth brought forward bacterial flocculation and increased biofilm formation (Fig. 15B). This suggests the existence of a signal of stationary phase in KT2440 that is required for triggering the phenotypes associated with high levels of c-di-GMP.

Target processes of c-di-GMP in KT2440

Plasmid pMAMV1 has been described above. When it is harbored by the wt strain KT2440, it confers high levels of c-di-GMP through the expression of *rup4959* from its own promoter. This plasmid was introduced into miniTn5 mutant derivatives of KT2440 with the aim of identifying effectors and/or target processes participating in the c-di-GMP signaling pathway. Table 4 summarizes in a semi-quantitative mean the phenotypes conferred by *rup4959* as assessed in the plasmid pMAMV1 to diverse mutant strains in comparison to the wt. Control plasmid pBBR1MCS-5 without insert did not have any effect upon phenotypes. This table includes mutants in traits with a role in the development of phenotypes known to be regulated by the second messenger such as motility (Kim and McCarter, 2007; Simm *et al.*, 2004) and EPS biosynthesis (Bobrov *et al.*, 2008; Nakhmchik *et al.*, 2008). Mutants in related functions like adhesion and the biosynthesis of peptidoglycans and lipopolysaccharides (LPS) are also included. As expected, RpoS minus mutant C1R1 carrying pMAMV1 did not exhibit (not shown) any of the phenotypes associated with high levels of c-di-GMP in the wt (Fig. 12 and 13) as a result of the absence of *rup4959* expression. Defective strains in flagella and pili developed the same pleiotropic phenotype as the wt, as an indication that these appendices were not essential for the establishment of the altered phenotype. This result is in agreement with the finding that genes for the synthesis of flagella were consistently repressed in a genome wide transcriptional analysis carried out with *Vibrio cholerae* under c-di-GMP overproducing conditions (Beyhan *et al.*, 2006). By contrast, four mutants hampered in LPS biosynthesis were at different grades affected in the phenotypes associated with high levels of the second messenger (Table 4). Thus *rmIA* and in particular *galU* mutant, which in *P. aeruginosa* are responsible for the synthesis of the major sugar residues (dTDP-L-rhamnose and UDP-D-glucose, respectively) of the outer core oligosaccharide (Lam *et al.*, 2004), were seriously hampered in all the phenotypes tested (Table 4). In addition two mutants in the synthesis of the O-antigen side chain *wbpL* and PP1776, a *wbpW* homologue, did not give rise to wrinkly morphology (Table 4). Of these, mutants *galU*, *wbpL* and PP1776, showed higher production of calcofluor stainable EPS than the wt

under physiological levels of c-di-GMP (not shown). A similar result has been reported for a *P. putida* mutant in *wapH* homolog, which like *galU* is involved in core LPS biosynthesis (Hansen *et al.*, 2007). After having plasmid pMAMV1, only strains PP1776 and *wbpL* showed an increase in EPS whereas, intriguingly, *galU* and *rmIA* (pMAMV1) experimented a reduction down to the level of the wt without the plasmid. Although biosynthesis of cellulose has been reported in several bacteria as being regulated by c-di-GMP (García *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 1987), however a mutant of *P. putida* in PP2638, which is part of a cluster of genes for the synthesis of cellulose (Nelson *et al.*, 2002), did not present differences in calcofluor staining compared with the wild type, neither at physiological or high c-di-GMP. This and the fact that bacterial pellicle associated with elevated levels of c-di-GMP (Fig. 12C) could not be digested with cellulase treatment (not shown) suggested that the overproduction of an EPS different to cellulose was regulated by c-di-GMP in *P. putida*. For that reason, an *algD* mutant in the production of another EPS, alginate, was included in this study but no distinction with respect to the wild type was observed, and the same applied for a mutant in the biosynthesis of peptidoglycan (PP5084). Remarkably, a mutant in a so far uncharacterized polysaccharide specific of the strain KT2440 was negative in calcofluor staining independently on pMAMV1. Interestingly a mutant in the largest adhesin LapA was unable to develop a biofilm even at high levels of c-di-GMP, so confirming the essentiality of this adhesin in the biofilm formation in KT2440 (Yousef-Coronado *et al.*, 2008). The first domain identified as interacting with c-di-GMP was PilZ (Benach *et al.*, 2007; Ryjenkov *et al.*, 2006). A total of six (Amikam and Galperin, 2006) or seven PilZ (Winsor *et al.*, 2009) domain proteins are encoded in the genome of this strain. Mutants in two of them (PP2164 and PP4397) did not show any distinction with the wt after the incorporation of pMAMV1 as an indication that neither of these are involved in the global c-di-GMP signaling pathway of *P. putida*. Another two genes encoding PilZ domain proteins are integrated in the operon for alginate biosynthesis (*alg44*) and cellulose biosynthesis (*bcsA*). We present evidences here that neither of these EPS are essential for the establishment of the pleiotropic phenotype developed by c-di-GMP overproducing *P. putida*.

Experimental procedures

Bacterial strains, culture media and growth conditions.

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 3 and 4, respectively. *P. putida* KT2440 and its derivative strains were routinely grown at 30°C, unless otherwise indicated, in Luria-Bertani (LB) medium (Bertani, 1951) or basal M9 medium (Sambrook *et al.*, 1989) supplied with 1 mM MgSO₄, 6 µg/L Fe-citrate, trace metals as described before (Abril *et al.*, 1989), and with sodium benzoate (10 mM), sodium citrate (15 mM) or glucose (27 mM) as carbon sources. Casaminoacids (CAA) were added as indicated, 0.5% (w/vol). *Escherichia coli* strains were grown at 37°C in LB. *E. coli* DH5α was used for gene cloning. When appropriated, antibiotics were added to the medium at the following final concentrations (in µg/mL): ampicillin, 10; chloramphenicol, 10; kanamycin, 25 (*E. coli* strains), and 50 (*P. putida* strains); gentamicin, 10 (*E. coli* strains), and 100 (*P. putida* strains); streptomycin, 50 (*E. coli* strains), and 100 (*P. putida* strains), tetracycline, 10; rifampin, 10. Cyclohexamide (40 µg/ml) was added to agar medium for counting bacteria in experiments with soil. L-arabinose was added to a final concentration of 0.1% (w/vol) when required to induce the expression of *rup4959*.

In vitro DNA techniques

Total DNA extraction was performed using the method described by Rodríguez-Herva *et al.* (2007). DNA plasmid was isolated using Qiagen spin miniprep kit (cat. no. 27106, Hilden, Germany). DNA restriction, alkaline phosphatase reactions and ligations were performed as recommended by the manufacturer (Roche and New England Biolabs). DNA fragments were recovered from agarose gels with Qiagen gel extraction kit (cat. no. 28706, Hilden, Germany). Southern blot and colony hybridation were carried out as reported previously by Sambrook *et al.* (1989), using DNA probes labelled by PCR with digoxigenin-11-dUTP (Roche, cat. no. 11573179910). Competent cells were prepared using calcium chloride and transformations were performed by standard protocols (Sambrook *et al.*, 1989). Highly electrocompetent cells were prepared as described by Choi *et al.* (2006) and electrotransformed with an EC100 electroporator (EC apparatus corporation) according to the manufacturer's instructions. Expanded high fidelity Taq polymerase was used in the amplification of PCR fragments for cloning. The sequence of these PCR fragments were verified by sequencing to discard mutated amplicons. Reverse transcription PCR was carried out by using TitanTM One Tube RT-PCR System (Boehringer Mannheim, cat. no. 1855476).

RNA purification and preparation of labeled cDNA for microarrays experiments

Total RNA was isolated using TRI Reagent (Ambion, ref. 9738, Austin, TX, USA) followed by DNase treatment and a purification with RNeasy columns (Qiagen; catalog no. 74104). For each reaction, 30 µg of RNA were primed with 7.5 µg of pd(N)₆ random hexamers (Amersham; catalog no. 27-2166-01) and cDNA probes were synthesized as described previously (Matilla *et al.*, 2007). Cy3 or Cy5 fluorescent dyes (mono-reactive NHS-esters; Amersham Biosciences, cat. no. PA23001 and PA25001, respectively) were used to label control and problem samples, respectively. Labelling efficiency was assessed using a NanoDrop ND1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA).

Microarray hybridization and data analysis

The technical description of the *P. putida* genome array is available at the ArrayExpress repository for microarray data (accession number A-MEXP-949). This genome-wide DNA chip has been used elsewhere (Yuste *et al.*, 2006). Hybridization conditions were as described before (Matilla *et al.*, 2007). Images were acquired at 10 µm resolution, and the background-subtracted median spot intensities were determined using GenePix Pro 5.1 image analysis software (Axon Instruments, Inc.). Spots with anomalies were discarded and excluded from further analysis. Spot signal intensities were normalized by applying the Lowess intensity-dependent normalization method (Yang *et al.*, 2002) and statistically analyzed using the Almazan System software (Alma Bioinformatics SL, Madrid, Spain). Three independent biological replicates were performed for each experiment. *P* values were calculated by Student's *t*-test. Unless otherwise specified, fold change was > 1.7, *P* value < 0.05, and the average signal-to noise (A) > 128.

Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Total RNA (2 µg) treated with *Turbo DNA free* (Ambion, ref 1907) was retrotranscribed to cDNA with Superscript II reverse transcriptase using random hexamers as primers. The specific primers pairs used to amplify cDNA were: QRT4959Fw 5'-CTCGACGTTGTGCAACTGAC-3' and QRT4959Rev 5'-TCGTGTACGCGGTAGATCTG-3' for *rup4959*; QRT16SFw 5'-AAAGCCTGATCCAGCCAT-3' and QRT16SRev 5'-GAAATTCCACCACCCTCTACC-3' for the gene encoding 16S rRNA; QRT4958Fw 5'-GGCAAGCTCAAGGCGAAGAA-3' and QRT4958Rev 5'-TGCTGGCAGAGCTGGTAGAA-3' for the gene encoding PP4958; qRT-PCR was performed as previously described (Matilla *et al.*, 2007) using iCycler iQ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Target cDNA from the experimental and reference samples were amplified in triplicate with three different dilutions (1:4 to 1:1000).

Results were normalized relative to those obtained for 16S rRNA. Quantification was based on analysis of threshold cycle (C_t) value as described by Pfaffl (Pfaffl, 2001).

Primer extension analysis

Primer extension was carried out basically as described before (Marqués *et al.*, 1993) with some modifications. Total RNA from stationary phase LB cultivated bacteria ($OD_{660nm} = 3.3$) was isolated as described above. Two oligonucleotides complementary to the *rup4959* mRNA were independently labelled at their 5' ends with [γ - ^{32}P]ATP (Perkin Elmer, NEG-502Z) using T4 polynucleotide kinase as described (Ausubel, 1992). Unincorporated [γ - ^{32}P] ATP was removed with Bio-Gel P-6 polyacrylamide gel spin columns (Bio-Rad, cat no. 732-6222), according to the manufacturer. The annealing mixture (10 μ L) containing 30 μ g of purified RNA, 2 μ L of 5X annealing buffer (2 M NaCl, 50 mM Pipes pH 6.4) and 5' end labelled primer (0.1 mM) was denaturalized at 90°C for 5 min followed by an incubation at 65°C for 5 min. Slow cooling down to 42°C was permitted. cDNA synthesis took place at 42°C for 2 h in a 50 μ L reaction volume containing dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, 1 mM each, DTT 5 mM, 50 U of avian myeloblastosis virus (AMV) reverse transcriptase (Roche, cat no. 11495062001), and 40 U of RNaseOUT (Invitrogen, cat no. 10777-019, Carlsbad, CA, USA). Samples were incubated with 0.5 μ L of RNase DNase-free (Roche, cat no. 11119915001) at 65°C for 15 min to remove remaining RNA. After precipitation and wash, cDNA was resuspended in 5 μ L of milli-Q water.

cDNA products were separated in denaturing 7 M urea-6.5% polyacrylamide gel in TBE buffer as reported (Sambrook *et al.*, 1989). Gel was exposed to a phosphor screen (Fuji Photo Film Cp., Ltd), which after 14-18 h was scanned with a phosphor imaging instrument and analyzed with Quantity one software (Bio-Rad).

T7 Sequencing Kit (USD corporation, cat no. 27168201, Cleveland, Ohio, USA) was used to obtain the sequence with 2 μ g of pMAMV1.

Mutants construction

All the directed mutants were constructed by homologous recombination using derivative plasmids of the suicide vector pKNG101 (Kaniga *et al.*, 1991). These plasmids, which are listed in Table 2 contain mutant alleles for the replacement of wild type genes in the chromosome. In all cases plasmids were transferred to the *P. putida* KT2440 by triparental conjugation using as donor *E. coli* CC118 λ pir and as helper *E. coli* HB101 (pRK600), following indications described before (Ramos-Gonzalez and Molin, 1998). All the mutants were confirmed by PCR and southern blot analysis.

Wild type *rup4959* and genes encoding PP4958 and PP4957 were isolated from a KT2440 gene library (Ramos-González, 1993) by colony hybridation (Sambrook *et al.*, 1989) using a 0.6-kb gene probe amplified with primers PP4959+ (5'-GGCAATCAGCGTACCCGAC-3') and PP4959- (5'-CGGGTCAGTAATGGCCTGG-3'). Cosmid pMAMV0 containing the gene cluster *rup4959-4957* was isolated and used in subsequent clonings for the generation of mutant alleles. Two polar mutants in *rup4959* labelled with two different antibiotic resistance cassettes were obtained with the mutant alleles Rup4959 Ω Tc and Rup4959 Ω km contained in pMAMV6 and pMAMV8, respectively. Non polar single mutants Rup4959 Ω Km, PP4958, and PP4957, and double mutant PP4958-4957 were generated with plasmids pMIR153, pMAMV17, pMAMV20, and pMAMV20B, respectively.

Successfully replacement of *anr* and *wbpL* wild type genes for a null allele and an inactivated allele were generated using pKNA-G (F. Rojo) and pKNG101wbpLKm (Junker *et al.*, 2001), respectively. pKNA-G was constructed as pKNAG101A (Ugidos *et al.*, 2008) but with a gentamycin resistance cassette obtained as a *SacI* fragment from pTn*Mod*-OGm (Dennis and Zylstra, 1998).

***Zea mays* and *Arabidopsis thaliana* root-exudates (RE) collection**

Corn seeds were surface sterilized and germinated for 48 h as described previously (Matilla *et al.*, 2007). Ten seedlings were placed in a grid fitted in a beaker containing 400 ml of sterile distilled water. Plants were maintained into a transparent container under sterile conditions for six days at room temperature. After confirming sterility by plating 100 μ L on LB, RE were filtered under vacuum (ϕ 45 μ m), freeze-dried and dissolved in 10 mL M9 salts. RE were stored at -20°C until use.

To obtain root exudates from *A. thaliana* ecotype Col-O, seeds were surface sterilized by vortexing for 1 min in bleach, followed by five rinses with sterile distilled water. Sterile seeds were germinated in commercial MS (Caisson laboratories, Inc MSP P0509) agar, 0.8%, pH 5.8, supplied with sucrose 1% (w/vol). After 7 days incubation under long day photoperiod (70 μ E/m²s, 8-h day and 16-h night cycle, 24 and 20°C, respectively), seedling were transferred to 6-wells plates containing 4 mL of MS sucrose 1% per well and so maintained for 18-days with shaking (70 rpm). For checking sterility and conservation of RE, same process as described for maize was followed.

***Zea mays* and *Arabidopsis thaliana* root colonization assays**

Maize root colonization and competitive root colonization assays were performed in gnotobiotic conditions as described before (Matilla *et al.*, 2007). *P. putida*

KT2440RTn7-Sm was used as wild type strain in experiments of competition with mutant strains. Inoculated seeds were planted in 50 ml Sterilin tubes containing sterile silica sand or in pots with a sterile mixture of soil and silica sand mixture (1:1, vol/vol). Bacteria were recovered from the rhizosphere 18 or 28 days after planted for Sterilin tubes and pots, respectively.

Competitive colonization assays were performed with *Arabidopsis* by transferring seven day-old seedlings from MS-agar medium to pots. These contained a mixture of potting soil and silica sand (12:5, vol/vol) inoculated with the wild type and the mutant strain at a final density of 5×10^3 CFU/g each. Bacteria were recovered from the rhizosphere after 18 and 32 days.

LB-agar medium supplemented with the appropriate antibiotics were used for CFU counting by drop plating.

Maize and *Arabidopsis* plants were maintained under controlled conditions with a photoperiod of 16-h light (24°C) and 8-h dark (20°C). Plants were watered with plant nutrient solution supplemented with Fe-EDTA and MS micronutrients (maize) (Matilla *et al.*, 2007) and with modified half-strength Hoagland's nutrient solution (*Arabidopsis*) (Pieterse *et al.*, 1996).

Construction of transcriptional and translational fusions

A transcriptional fusion of the PCR-amplified promoter of *rup4959* to '*lacZ*' was generated. The fragment of 271 bp obtained with primers 4959*KpnI* 5'-GCAGGTACCAGCGCTACCTGAAA-3' and 4959*SphI* 5'-GCCATGCATGCTGCTTCTCTGTT-3' was cloned in pMBLT to generate pMAMV10. Absence of mutations was confirmed by DNA sequencing. The *KpnI*-*SphI* fragment from pMAMV10 was cloned at the same sites of the reporter plasmid pMP220 to yield pMAMV12. A transcriptional fusion to '*dsred*' (*Discosoma sp.* red fluorescent protein) of the 0.28-kb *HindIII*-*StuI* fragment from pMAMV10 containing the *rup4959* promoter region was cloned at the same sites of pRU1105 to generate pMIR149.

For the generation of a translational fusion of *rpoS* to '*lacZ*', plasmid pMP220 was digested with *BamHI* and subsequently religated into pMP220-*BamHI* in order to release the ribosome binding site and the chloramphenicol acetyltransferase start codon contained in pMP220. After partial digestion of pMP220-*BamHI* with *SmaI*, the 1.2 kb *StuI*-*ZraI* fragment from pMIR61 containing the *rpoS* promoter and 45 bp of the gene was cloned at the *SmaI* site immediately upstream to '*lacZ*' (of the two *SmaI* sites present in pMP220-*BamHI*) to yield pMAMV21.

β -galactosidase assays

β -galactosidase activity was measured as described before (Miller, 1972). Overnight bacterial cultures in LB or M9 minimal medium were diluted 100-fold in the same medium and grew for 1 h. Then the cultures were adjusted to an initial OD_{600nm} of 0.05 and activity was measured in chloroform/SDS permeabilized cells. Experiments were repeated at least three times with two technical repeats per sample.

Induction analyses were performed in M9 medium with citrate as carbon source. As the culture reached OD_{600nm} = 1, effector compounds were added at the indicated concentration. Activity was measured 5 h after challenging. Benzoxazinone derivatives used at 0.1 0.25 and 0.5 mM were 2,4-dihydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIBOA), dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (DIMBOA), 2-hydroxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (HBOA), and 2-hydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one (HMBOA). Root exudates were added as 50 μ L per mL of a solution 40-fold concentrated, in the case of maize, and 12.5, 31.3 and 62.5 μ L per mL of a solution 80-fold concentrated, in the case of Arabidopsis.

Biofilm assay and quantification

Biofilm formation assays in borosilicate tubes were carried out with bacterial cultures obtained in LB medium or M9 medium with glucose as carbon source and supplemented with 0.5% (w/vol) CAA. Overnight cultures were diluted down to OD_{660nm} = 0.05 and 1 ml of this cell suspension per tube was incubated under orbital shaking (40 rpm). At the indicated times, cultures were removed, the tubes rinsed twice with water and the remaining biofilms were stained with 2 ml of a solution of crystal violet 0.5% (w/vol) for 15 min at room temperature. Staining solution was discarded and the stained tubes were washed three times with water. For quantification, crystal violet was solubilised with ethanol 70% and spectrophotometrically detected at 540 nm as described previously (O'Toole and Kolter, 1998).

Motility assays

Swimming motility assays were performed in LB-Difco agar (0.3%) medium plates at 30°C. Swarming motility assays were carried out at 25°C in PG-Difco agar (0.5%) medium consisting of proteose peptone No. 3 (Difco 212693), 0.5% (w/vol) and glucose 0.2% (w/vol) as describe before (Matilla *et al.*, 2007).

Exopolysaccharides detection with calcofluor white staining

Calcofluor white is a fluorescent dye which can bind (1-3) and (1-4)- β -D-glucopyranosyl units (Wood, 1980). Exopolysaccharides (EPS) production was detected in LB medium plates containing 25 μ g/ml calcofluor white (Fluorescent Brightener 28; Sigma, cat. no. F3543) in Tris-HCl 10 mM pH 8 NaCl 0.9%. To minimize the production of the fluorescent siderophore pyoverdine, FeCl₃ 5 μ M was added.

Cellulase treatment

Bacterial pellicles were obtained from overnight cultures of KT2440 or its derivative strains bearing (pMAMV1) which were grown in six wells plates under orbital shaking (100 rpm) at 30°C. These pellicles were washed at least twice with distilled water and treated with cellulase 0.1% (w/vol) from *Aspergillus niger* (Sigma, cat no. C1184) in 50 mM citrate buffer pH 4.6 (Solano *et al.*, 2002). Pellicle integrity was monitored after 72 h incubation at 37°C.

Extraction and quantification of c-di-GMP

For the extraction of nucleotides from the bacteria, boiling lysis of cells and further ethanol precipitation was performed, basically as reported by Amikam and coworkers (1995). Bacteria were cultivated in LB up to an optical density at 660 nm of around 3, time at which *rup4959* expression had started. Formaldehyde to a final concentration of 0.19% was used to stop metabolism. Cells corresponding to 15 mL of the cultures were washed in ice-cold water, concentrated down to 300 μ L and lysed at 100°C for 15 min. Subsequently, nucleotides were extracted twice with 700 μ L of ice-cold ethanol 65% (vol/vol). After removing cell debris, extracts were vacuum-dried, solved in 350 μ L of ammonium acetate 10 mM pH 6, filtered with 0.45 μ m pore size nitrocellulose (Pall Life Sciences, cat. no. 4556T) and stored at -80°C. Nucleotides extracts were subjected to HPLC separation on an Agilent 1100 Series using a 125 x 3 mm reverse phase column (Waters Spherisorb RP-18, 5 μ m particle size) with ultraviolet detection at 248 nm. Samples were loaded onto the column equilibrated with an aqueous solution containing 98% ammonium acetate 10 mM pH 6.0 and 2% acetonitrile. Compounds were eluted by a linear gradient increasing the acetonitrile concentration to 95% during 20 min, followed by an isocratic step for additional 10 min. Flow rates of 0.85 ml min⁻¹ were applied. c-di-GMP was detected by MS/MS with Esquire 6000 Bruker mass spectrometer in a positive electrospray ionization. c-di-GMP fragmentation was performed as previously described (Simm *et al.*, 2004). C-di-GMP quantification in the cellular extracts was estimated by calculating the peaks areas of the fragment using the

mass to charge rate of 248 and was referred to wet cell weight. Concentrations were extrapolated from the standard curve obtained with pure c-di-GMP in the range between 31.25 and 1450 nM. Data are the average of three independent biological replicates. The limit of detection of this method was 20-30 nM.

Gas chromatography isotope ratio mass spectrometry (GC-IRMS) analysis

Gas chromatography on Trace GC Ultra™ (Thermo Fisher Scientific) was coupled to a Delta Plus XP isotope ratio mass spectrometer (ThermoFinnigan) and used to determine oxygen percentage in the air of the bacterial cultures. Gas chromatograph was equipped with a J&W GS-CarbonPlot column (30 m length, 0.32 mm inner diameter, 1.5 µm film thickness) working isothermally at 150°C. Injector temperature was 200°C with split ratio 1:100. Helium was employed as the carrier gas with a flow rate of 2 ml/min. Twenty microliters of air volume per measurement were injected using a microliter gas syringe. Mass spectrometer was configured to detect mass of atomic mass unit of 33 from the $^{17}\text{O}^{16}\text{O}$ oxygen isotopologue. Samples were analyzed in duplicate with three technical repeats per sample and a run time of 3 min per injection.

Acknowledgements

We thank E. Duque, F. Rojo, C. Pini, M. Nilsson and T. Tolker-Nielsen for the generous gift of strains and plasmids; G. O'Toole and E. Eljarrat for providing c-di-GMP and benzoxazinones, respectively; and M. Espinosa for helpful discussions on the manuscript. This work was supported by grants BFU2006-09078 from the Plan Nacional de I+D+I, and P07-CVI-03156 from the Junta de Andalucía. M. A. Matilla was the recipient of a FPU fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia.

REFERENCES

- Abril, M.A., Michan, C., Timmis, K.N., and Ramos, J.L. (1989) Regulator and enzyme specificities of the TOL plasmid-encoded upper pathway for degradation of aromatic hydrocarbons and expansion of the substrate range of the pathway. *J Bacteriol* **171**: 6782-6790.
- Amikam, D., Steinberger, O., Shkolnik, T., Ben-Ishai, Z. (1995) The novel cyclic dinucleotide 3'-5' cyclic diguanylic acid binds to p21(ras) and enhances DNA synthesis but not cell replication in the Molt 4 cell line. *Biochem J* **311**: 921-927.
- Amikam, D., and Galperin, M.Y. (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics* **22**: 3-6.
- Becker, G., and Hengge-Aronis, R. (2001) What makes an *Escherichia coli* promoter σ^S dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of σ^S . *Mol Microbiol* **39**: 1153-1165.

Benach, J., Swaminathan, S.S., Tamayo, R., Handelman, S.K., Folta-Stogniew, E., Ramos, J.E., *et al.* (2007) The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *EMBO J* **26**: 5153-5166.

Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293-300.

Beyhan, S., Tischler, A.D., Camilli, A., and Yildiz, F.H. (2006) Transcriptome and phenotypic responses of *Vibrio cholerae* to increased cyclic di-GMP level. *J Bacteriol* **188**: 3600-3613.

Bobrov, A.G., Kirillina, O., Forman, S., Mack, D., and Perry, R.D. (2008) Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: Topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environ Microbiol* **10**: 1419-1432.

Boyer, H.W., and Roulland-Dussoix, D. (1969) A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**: 459-472.

Brimecombe, M.J., De Leij, F.A.A.M., and Lynch, J.M. (2007) Rhizodeposition and microbial populations. In *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Pinton, R., Varanini, Z., and Nannipieri, P. (eds.) CRC Press, New York, pp. 73-109.

Capdevila, S., Martínez-Granero, F.M., Sánchez-Contreras, M., Rivilla, R., and Martín, M. (2004) Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology* **150**: 3889-3897.

Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Mulders, I.H.M., Dekkers, L.C., and Lugtenberg, B.J.J. (2001) Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Mol Plant Microbe In* **13**: 1340-1345.

Choi, K.H., Kumar, A., and Schweizer, H.P. (2006) A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. *J Microbiol Methods* **64**: 391-397.

Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A., and Jenal, U. (2005) Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J Biol Chem* **280**: 30829-30837.

Cowles, C.E., Nichols, N.N., and Harwood, C.S. (2000) BenR, a Xy1S homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida*. *J Bacteriol* **182**: 6339-6346.

Dekkers, L.C., Van Der Bij, A.J., Mulders, I.H.M., Phoelich, C.C., Wentwoord, R.A.R., Glandorf, D.C.M., *et al.* (1998) Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol Plant Microbe In* **11**: 763-771.

Dennis, J.J., and Zylstra, G.J. (1998) Plasposons: Modular self-cloning minitransposon derivatives for rapid genetic analysis of gram-negative bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2710-2715.

- Dubey, A.K., Baker, C.S., Romeo, T., and Babitzke, P. (2005) RNA sequence and secondary structure participate in high-affinity CsrA-RNA interaction. *RNA* **11**: 1579-1587.
- Espinosa-Urgel, M., Chamizo, C., and Tormo, A. (1996) A consensus structure for σ^S -dependent promoters. *Mol Microbiol* **21**: 657-659.
- Fellay, R., Frey, J., and Krisch, H. (1987) Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for in vitro insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* **52**: 147-154.
- Figurski, D.H., and Helinski, D.R. (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1648-1652.
- Finan, T.M., Kunkel, B., De Vos, G.F., and Signer, E.R. (1986) Second symbiotic megaplasmid in *Rhizobium meliloti* carrying exopolysaccharide and thiamine synthesis genes. *J Bacteriol* **167**: 66-72.
- Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.R., *et al.* (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **36**: D281-D288.
- Friedman, L., and Kolter, R. (2004b) Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol* **186**: 4457-65.
- Gaal, T., Ross, W., Estrem, S.T., Nguyen, L.H., Burgess, R.R., and Gourse, R.L. (2001) Promoter recognition and discrimination by $E\sigma^S$ RNA polymerase. *Mol Microbiol* **42**: 939-954.
- Galimand, M., Gamper, M., Zimmerman, A., and Haas, D. (1991) Positive FNR-like control of anaerobic arginine degradation and nitrate respiration in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **173**: 1598-1606.
- Galperin, M.Y. (2005) A census of membrane-bound and intracellular signal transduction proteins in bacteria: bacterial IQ, extroverts and introverts. *BMC Microbiol* **5**: 35.
- Galperin, M.Y. (2006) Structural classification of bacterial response regulators: Diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol* **188**: 4169-4182.
- García, B., Latasa, C., Solano, C., García-Del Portillo, F., Gamazo, C., and Lasa, I. (2004) Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Mol Microbiol* **54**: 264-277.
- Grainger, D.C., Aiba, H., Hurd, D., Browning, D.F. and Busby, S.J.W. (2007) Transcription factor distribution in *Escherichia coli*: Studies with FNR protein. *Nucleic Acids Res* **35**: 269-278.
- Hansen, S.K., Haagensen, J.A.J., Gjermansen, M., Jorgensen, T.M., Tolker-Nielsen, T., and Molin, S. (2007) Characterization of a *Pseudomonas putida* rough variant evolved in a mixed-species biofilm with *Acinetobacter* sp. strain C6. *J Bacteriol* **189**: 4932-4943.
- Hay, I.D., Remminghorst, U. and Rehm, B.H.A. (2009) MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *App Environ Microbiol* **75**: 1110-1120.

- He, Y.W., Boon, C., Zhou, L., and Zhang L.H. (2009) Co-regulation of *Xanthomonas campestris* virulence by quorum sensing and a novel two-component regulatory system RavS/RavR. *Mol Microbiol* **71**: 1464-1476.
- Hengge, R. (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 263-273.
- Herrero, M., de Lorenzo, V., and Timmis, K.N. (1990) Transposon vectors containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *J Bacteriol* **172**: 6557-6567.
- Hickman, J.W., Tifrea, D.F., and Harwood, C.S. (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 14422-14427.
- Hickman, J.W., and Harwood, C.S. (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol* **69**: 376-389.
- Jonas, K., Melefors, Ö., and Römling, U. (2009) Regulation of c-di-GMP metabolism in biofilms. *Future Microbiol* **4**: 341-358.
- Jovcic, B., Bertani, I., Venturi, V., Topisirovic, L., and Kojic, M. (2008) 5' untranslated region of the *Pseudomonas putida* WCS358 stationary phase sigma factor *rpoS* mRNA is involved in RpoS translational regulation. *J Microbiol* **46**: 56-61.
- Junker, F., Rodriguez-Herva, J.J., Duque, E., Ramos-Gonzalez, M.I., Llamas, M., and Ramos, J.L. (2001) A WbpL mutant of *Pseudomonas putida* DOT-T1E strain, which lacks the O-antigenic side chain of lipopolysaccharides, is tolerant to organic solvent shocks. *Extremophiles* **5**: 93-99.
- Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M., and Römling, U. (2006) Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **60**: 602-616.
- Kang, Y., Weber, K.D., Qiu, Y., Kiley, P.J., and Blattner, F.R. (2005) Genome-wide expression analysis indicates that FNR of *Escherichia coli* K-12 regulates a large number of genes of unknown function. *J Bacteriol* **187**: 1135-1160.
- Kaniga, K., Delor, I., and Cornelis, G.R. (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in Gram-negative bacteria: Inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**: 137-141.
- Karunakaran, R., Mauchline, T.H., Hosie, A.H.F., and Poole, P.S. (2005) A family of promoter probe vectors incorporating autofluorescent and chromogenic reporter proteins for studying gene expression in Gram-negative bacteria. *Microbiology* **151**: 3249-3256.
- Kazmierczak, B.I., Lebron, M.B., and Murray, T.S. (2006) Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **60**: 1026-1043.

Kim, Y.K., and McCarter, L.L. (2007) ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **189**: 4094-4107.

Klauck, E., Typas, A., and Hengge, R. (2007) The sigmaS subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. *Sci Prog* **90**: 103-127.

Kovach, M.E., Elzer, P.H., Hill, D.S., Robertson, G.T., Farris, M.A., Roop II, R.M., and Peterson, K.M. (1995) Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176.

Kuchma, S.L., Brothers, K.M., Merritt, J.H., Liberati, N.T., Ausubel, F.M., and O'Toole, G.A. (2007) BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *J Bacteriol* **189**: 8165-8178.

Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D.G., et al. (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2839-2844.

Lange, R., and Hengge-Aronis, R. (1991) Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 49-59.

Lee, S.J., and Gralla, J.D. (2001) Sigma38 (*rpoS*) RNA Polymerase Promoter Engagement via -10 Region Nucleotides. *J Biol Chem* **276**: 30064-30071.

Lim, B., Beyhan, S., Meir, J., and Yildiz, F.H. (2006) Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: Modulation of rugosity and biofilm formation. *Mol Microbiol* **60**: 331-348.

Lynch, M.D., and Gill, R.T. (2006) Broad host range vectors for stable genomic library construction. *Biotechnol Bioeng* **94**: 151-158.

Lugtenberg, B.J.J., Dekkers, L. and Bloemberg, G.V. (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol* **39**: 461-490.

Marqués, S., Holtel, A., Timmis, K.N., and Ramos, J.L. (1993) Analysis of the mRNA structure of the *Pseudomonas putida* TOL *meta*-fission pathway operon. *Biochim Biophys Acta* **1216**: 227-236.

Mark, G.L., Dow, J.M., Kiely, P.D., Higgins, H., Haynes, J., Baysse, C., Abbas, A., Foley, T., Franks, A., Morrissey, J. and O'Gara F. (2005) Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 17454-17459.

Matilla, M.A., Espinosa-Urgel, M., Rodriguez-Herva, J.J., Ramos, J.L., and Ramos-Gonzalez, M.I. (2007) Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol* **8**: R179.

Matilla, M.A., Ramos, J.L., Bakker, P.A.H.M., Doornbos, R., Badri, D.V., Vivanco, J.M., and Ramos-González, M.I. (2010) *Environ Microbiol Rep*. In press.

- Matcher, G.F., Burton, S.G., and Dorrington, R.A. (2004) Mutational analysis of the hydantoin hydrolysis pathway in *Pseudomonas putida* RU-KM3s. *Appl Microbiol Biotechnol*, **65**: 391-400.
- Méndez-Ortiz M.M., Hyodo M., Hayakawa Y., and Membrillo-Hernandez J. (2006) Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid. *J Biol Chem* **281**: 8090-8099.
- Miller, J. H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Nakhamchik, A., Wilde, C., and Rowe-Magnus D.A. (2008) Cyclic-di-GMP regulates extracellular polysaccharide production, biofilm formation, and rugose colony development by *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4199-4209.
- Nakazawa, T. (2002) Travels of a *Pseudomonas*, from Japan around the world. *Environ Microbiol* **4**: 782-786.
- Navarro, M.V.A.S., De, N., Bae, N., Wang, Q., and Sondermann, H. (2009) Structural Analysis of the GGDEF-EAL Domain-Containing c-di-GMP Receptor FimX. *Structure* **17**: 1104-1116.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., *et al.* (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* **4**: 799-808.
- Nunn, D.N. and Lory, S. (1993) Cleavage, methylation, and localization of the *Pseudomonas aeruginosa* export proteins XcpT, -U, -V, and -W. *J Bacteriol* **175**: 4375-4382.
- O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* **28**: 449-461.
- Pini, C.V., Bernal, P., Godoy, P., Ramos, J.L., and Segura, A. (2009). Cyclopropane fatty acids are involved in organic solvent tolerance but not in acid stress resistance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *Microbial Biotechnol* **2**: 253-261.
- Ramos-González, M.I. (1993) Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales contra *Pseudomonas putida* portadora de ADN recombinante: clonación de un gen que determina un antígeno de superficie. PhD thesis. University of Granada, Granada, Spain.
- Ramos-Gonzalez, M.I., and Molin, S. (1998) Cloning, sequencing, and phenotypic characterization of the *rpoS* gene from *Pseudomonas putida* KT2440. *J Bacteriol* **180**: 3421-3431.
- Ramos-González, M.I., Campos, M.J., and Ramos, J.L. (2005) Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: In vitro expression technology capture and identification of root-activated promoters. *J Bacteriol* **187**: 4033-4041.
- Rao, F., Yang, Y., Qi, Y., and Liang, Z.X. (2008) Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: A study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **190**: 3622-3631.

Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Jiang, B.L., He, Y.Q., Feng, J.X., Tang, J.L. and Dow, J.M. (2007) Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Mol Microbiol* **63**: 429-442.

Rodríguez-Herva, J.J., García, V., Hurtado, A., Segura, A., and Ramos, J.L. (2007) The ttgGHI solvent efflux pump operon of *Pseudomonas putida* DOT-T1E is located on a large self-transmissible plasmid. *Environ Microbiol* **9**: 1550-1561.

Römling, U., and Amikam, D. (2006) Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current Opinion in Microbiology*, **9**: 218-228.

Römling, U., and Simm, R. (2009). Prevailing concepts of c-di-GMP signalling. *Contrib Microbiol* **16**: 161-181.

Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Ohana, P., Mayer, R., *et al.* (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**: 279-281.

Ryjenkov, D.A., Simm, R., Romling, U., and Gomelsky, M. (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* **281**: 30310-30314.

Salmon, K., Hung, S.P., Mekjian, K., Baldi, P., Hatfield, G.W., and Gunsalus, R.P. (2003) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12: The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem* **278**: 29837-29855.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.

Silby, M.W., Cerdeño-Tárraga, A.M., Vernikos, G.S., Giddens, S.R., Jackson, R.W., *et al.* (2009) Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol* **10**: R51.

Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M., and Römling, U. (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol* **53**: 1123-1134.

Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C., and Lasa, I. (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: Critical role of cellulose. *Mol Microbiol* **43**: 793-808.

Solano, C., García, B., Latasa, C., Toledo-Arana, A., Zorraquino, V., Valle, J., *et al.* (2009) Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 7997-8002.

Spaink, H.P., Okker, R.J.H., Wijffelman, C.A., Pees, E., and Lugtenberg, B.J.J. (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* **9**: 27-39.

Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M. and Rainey, P.B. (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol* **50**: 15-27.

Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H., Breaker, R.R. (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic Di-GMP. *Science* **321**: 411-413.

- Tamayo, R., Pratt, J.T., and Camilli, A. (2007) Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **61**: 131-148.
- Typas, A., Becker, G., and Hengge, R. (2007) The molecular basis of selective promoter activation by the σ^S subunit of RNA polymerase. *Mol Microbiol* **63**: 1296-1306.
- Ugidos, A., Morales, G., Rial, E., Williams, H.D., and Rojo, F. (2008) The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environ Microbiol* **10**: 1690-702.
- Ulrich, L.E., and Zhulin, I.B. (2007) MiST: a microbial signal transduction database. *Nucleic Acids Res* **35**: D386-D390.
- Venturi, V. (2003) Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: Why so different? *Mol Microbiol* **49**: 1-9.
- Vieira, J., and Messing, J. (1982) The pUC plasmids, and M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**: 259-268.
- Ware, E. (1950) The chemistry of the hydantoins. *Chem Rev*, **46**: 403-470.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G., and Hengge, R. (2006) Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the σ^S network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**: 1014-1034.
- Weinberg, M.V., and Maier, R.J. (2007) Peptide transport in *Helicobacter pylori*: Roles of Dpp and Opp systems and evidence for additional peptide transporters. *J Bacteriol* **189**: 3392-3402.
- Winsor, G.L., Van Rossum, T., Lo, R., Khaira, B., Whiteside, M.D., Hancock, R.E.W., and Brinkman, F.S.L. (2009) *Pseudomonas* Genome Database: Facilitating user-friendly, comprehensive comparisons of microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **37**: D483-D488.
- Wolfe, A.J., and Visick, K.L. (2008) Get the message out: Cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol* **190**: 463-475.
- Wood, P.J. (1980) Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. *Carbohydr Res* **85**: 271-287.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., et al. (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* **17**: 3469-3478.
- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15.
- Yousef-Coronado, F., Travieso, M.L., and Espinosa-Urgel, M. (2008) Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol Lett* **288**: 118-124.
- Yuste, L., Hervas, A.B., Canosa, I., Tobes, R., Jiménez, J.I., Nogales, J., et al. (2006) Growth phase-dependent expression of the *Pseudomonas putida* KT2440

transcriptional machinery analysed with a genome-wide DNA microarray. *Environ Microbiol* **8**: 165-177.

Zhang, J., Boone, L., Kocz, R., Zhang, C., Binns, A.N., and Lynn, D.G. (2000) At the maize/*Agrobacterium* interface: Natural factors limiting host transformation. *Chem Biol* **7**: 611-621.

Zimmermann, A., Reimann, C., Galimand, M., and Haas, D. (1991) Anaerobic growth and cyanide synthesis of *Pseudomonas aeruginosa* depend on *anr*, a regulatory gene homologous with *fnr* of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**: 1483-1490.

Table 1. Bacterial strains used in this work.

Strain and/or locus	Genotype or relevant characteristic ^a	Reference or source
<i>E. coli</i>		
CC118 λ <i>pir</i>	λ <i>pir</i> Rif ^r	Herrero <i>et al.</i> (1990)
DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (Δ 80) <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17</i> ($r_K^- m_K^-$) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Woodcock (1989)
HB101	F ⁻ Δ (<i>gpt-proA</i>)62 <i>leuB6 supE44 ara-14 galK2 lacY1</i> Δ (<i>mcrC-mrr</i>) <i>rpsL20</i> (Sm ^r) <i>xyl-5 mtl-1 recA13 thi-1</i>	Boyer and roulland-Dussoix (1969)
MC4100	F ⁻ <i>araD139 (argF-lac)U169 rpsL150</i> (Sm ^r) <i>relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rpsR</i> . Wild <i>rpoS</i> allele.	Lange and Hengge-Aronis (1991)
<i>P. putida</i>		
KT2440	Wild type, prototroph	Nakazawa (2002)
KT2440RTn7- Ω Sm1	Rif ^r , Sm ^r ; extragenic site-specific insertion of miniTn7 ^b	Matilla <i>et al.</i> (2007)
C1R1 (PP1623)	<i>rpoS</i> minus derivative of KT2440	Ramos-González and Molin (1998)
<i>algD</i> (PP1288)	Km ^r ; <i>algD</i> defective in alginate biosynthesis	M.I. Ramos-González
<i>anr</i> (PP4265)	Gm ^r ; <i>anr</i> minus derivative of KT2440	This study
<i>flhC</i> (PP4378)	Rif ^r , Km ^r ; defective in flagellin ^b	PRCC
<i>galU</i> (PP3821)	Km ^r ; defective in UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase (LPS core biosynthesis)	Yousef-Coronado <i>et al.</i> (2008)
<i>lapA</i> (PP0168)	Km ^r ; defective in the largest surface adhesin present in KT2440	Yousef-Coronado <i>et al.</i> (2008)
MN39	Gm ^r ; mutant strain with a deletion in loci PP3132-PP3142 (uncharacterized polysaccharide biosynthesis)	T. Tolker-Nielsen
<i>pil(O + P)</i> (PP5081)	Rif ^r , Km ^r ; defective in type IV pili biogenesis protein ^b	PRCC
<i>ppsD</i> (PP4219)	Rif ^r , Km ^r ; defective in pyoverdine biosynthesis ^b	PRCC
<i>rmlA</i> (PP1783)	Rif ^r , Km ^r ; defective in glucose-1-phosphate thymidyltransferase (LPS core biosynthesis) ^b	PRCC
<i>wbpL</i> (PP1804)	Km ^r ; defective in glycosyl transferase (LPS O-antigen side chain) ^b	This study
<i>wbpW</i> -like (PP1776)	Rif ^r , Km ^r ; defective in mannose-1-phosphate guanylyltransferase (LPS O-antigen side chain) ^b	PRCC
PP2164	Rif ^r , Km ^r ; defective in uncharacterized PilZ domain protein ^b	PRCC
PP2638	Rif ^r , Km ^r ; defective in cellulose synthase subunit BcsC ^b	PRCC
PP3127	Rif ^r , Km ^r ; defective in exopolysaccharide transport protein, putative ^b	PRCC
PP4397	Rif ^r , Km ^r ; defective in uncharacterized PilZ domain protein ^b	PRCC
PP4957	Rif ^r , Km ^r ; non polar mutant in PP4957 ^b	This study
PP4958	Rif ^r , Km ^r ; non polar mutant in PP4958 ^b	This study
PP4958-4957	Rif ^r , Km ^r , double mutant in PP4957-4958 ^b	This study
Rup4959Km	Rif ^r , Km ^r ; <i>rup4959</i> non polar mutant ^b	This study
Rup4959 Ω Km	Rif ^r , Km ^r ; <i>rup4959</i> mutant polar upon PP4958 and PP4957 ^b	This study
Rup4959 Ω Tc	Rif ^r , Tc ^r ; <i>rup4959</i> mutant polar upon PP4958 and PP4957 ^b	This study
PP5084	Rif ^r , Km ^r ; defective in penicillin-binding protein (murein biosynthesis) ^b	PRCC

^a Gm, gentamicin; Km, kanamycin Rif, rifampin; Sm, streptomycin; Tc, tetracycline.

^b *P. putida* strains rifampin resistant are derived from KT2440R (Espinosa-Urgel and Ramos, 2004).

Table 2. Plasmids used in this work.

Plasmid	Relevant characteristic ^a	Reference or source
pBBR1MCS-5	Gm ^r <i>oriRK2 mobRK2</i> P _{lac} fused to the α peptide of <i>lacZ</i>	Kovach <i>et al.</i> (1995)
pHP45 Ω Tc	Tc ^r , Ap ^r ; Ω /Tc interposon	Fellay <i>et al.</i> (1987)
pKNG101	Sm ^r <i>oriR6K mob sacBR</i>	Kaniga <i>et al.</i> (1991)
pMBL-T	Ap ^r MCS, P _{lac} fused to the α peptide of <i>lacZ</i> ; PCR cloning vector	Molecular Biolabs
pMBTB-2	Km ^r <i>oriRK2 mob araC</i> -P _{BAD} expression plasmid	Lynch and Gill (2006)
pMP220	Tc ^r <i>oriRK2 'lacZ</i>	Spaink <i>et al.</i> (1987)
pMP220-Bam	Tc ^r ; pMP220 with a deletion of a 238-bp <i>Bam</i> HI fragment containing ribosome binding site and ATG of <i>cat</i>	This study
pRK600	Cm ^r <i>mob tra</i>	Finan <i>et al.</i> (1986)
pRK2013	Km ^r <i>mob tra</i>	Figurski and Helinski (1979)
pRU1105	Gm ^r <i>oriRK2 'dsred</i>	Karunakaran <i>et al.</i> (2005)
pUC18, pUC19	Ap ^r MCS, P _{lac} fused to the α peptide of <i>lacZ</i>	Vieira and Messing (1982)
pUC18Not	Ap ^r identical to pUC18 but with <i>Not</i> I polylinker of pUC18- <i>Not</i> I	Herrero <i>et al.</i> (1990)
p34S-Km3	Km ^r , Ap ^r <i>Km3</i> antibiotic cassette	Dennis and Zylstra (1998)
pMAMV0	Tc ^r ; cosmid of <i>P. putida</i> genebank, derivative of pLAFR3, containing the cluster <i>rup4959-4957</i>	This study
pMAMV1	Ap ^r ; 5-kb <i>Kpn</i> II/ <i>Bsa</i> BI fragment of pMAMV0 containing <i>rup4959-4957</i> genes was inserted into the <i>Kpn</i> II/ <i>Sma</i> I sites of pBBR1MCS-5	This study
pMAMV2	Ap ^r ; 4.2-kb <i>Kpn</i> II/ <i>Sma</i> I fragment of pMAMV1 containing <i>rup4959-4957</i> genes was inserted into the <i>Kpn</i> II/ <i>Hinc</i> II sites of pUC18Not	This study
pMAMV4	Gm ^r , Tc ^r ; replacement of 1.5-kb <i>Xmn</i> I fragment internal to <i>rup4959</i> of pMAMV1 for a 2.1-kb <i>Sma</i> I cassette covering Ω /Tc from pHP45 Ω -Tc	This study
pMAMV5	Ap ^r , Tc ^r ; 4.7-kb <i>Kpn</i> II/ <i>Sma</i> I fragment of pMAMV4 containing Ω /Tc was inserted into the <i>Kpn</i> II/ <i>Hinc</i> II sites of pUC18Not	This study
pMAMV6	Sm ^r , Tc ^r ; 4.8-kb <i>Not</i> I fragment of pMAMV5 was cloned at the same site in pKNG101	This study
pMAMV8	Ap ^r , Km ^r ; deletion of Tc in pMAMV5 as a 0.8-kb <i>Nru</i> II/ <i>Eco</i> RV fragment and insertion into the same sites of 0.95-kb <i>Sma</i> I <i>km3</i> cassette of p34S-Km3, transcriptional and translational stop signals of Ω element are present	This study
pMAMV9	Sm ^r ; Km ^r ; 5-kb <i>Not</i> I fragment of pMAMV8 was cloned at the same site in pKNG101	This study
pMAMV10	Ap ^r ; pMBL-T with a PCR fragment of 271 bp generated with oligos 4959 <i>Kpn</i> II and 4959 <i>Sph</i> I covering P _{<i>rup4959</i>}	This study
pMAMV12	Tc ^r ; 0.25-kb <i>Kpn</i> II/ <i>Pst</i> I fragment of pMAMV10 containing P _{<i>rup4959</i>} was cloned at the same sites in pMP220	This study
pMAMV15	Ap ^r , Km ^r ; 0.95-kb <i>Sma</i> I fragment containing <i>km3</i> cassette of p34S-Km3 was inserted into <i>Ale</i> I site of PP4958 in pMAMV2	This study
pMAMV16	Ap ^r , Km ^r ; 0.95-kb <i>Sma</i> I fragment containing <i>km3</i> cassette of p34S-Km3 was inserted into <i>Bsa</i> AI site of PP4957 in pMAMV2	This study
pMAMV19	Ap ^r , Km ^r ; 0.3-kb <i>Ale</i> I/ <i>Bsa</i> AI deletion in pMAMV2 and insertion at same sites of 0.95-kb <i>Sma</i> I <i>km3</i> cassette of p34S-Km3	This study
pMAMV17	Sm ^r , Km ^r ; 5.2-kb <i>Not</i> I fragment of pMAMV15 cloned at the same site in pKNG101	This study
pMAMV20	Sm ^r , Km ^r ; 5.2-kb <i>Not</i> I fragment of pMAMV16 cloned at the same site in pKNG101	This study
pMAMV20B	Sm ^r , Km ^r ; 4.9-kb <i>Not</i> I fragment of pMAMV19 cloned at the same site in pKNG101	This study
pMAMV21	Tc ^r ; 1.2-kb <i>Stu</i> I/ <i>Zra</i> I fragment of pMIR61 containing the <i>rpoS</i> promoter was inserted in the right orientation to generate a translational fusion at the <i>Sma</i> I site immediately upstream to <i>'lacZ</i> in pMP220-Bam	This study
pMAMV29	Gm ^r ; 3.1-kb <i>Sac</i> II/ <i>Eco</i> RI fragment of pMAMV2 bearing <i>rup4959</i> was	This study

cloned at the same sites of pBBR1MCS-5

Table 2. cont.

pMIR61	Ap ^r ; pUN19Ø bearing <i>rpoS</i> from <i>P. putida</i>	Ramos-González and Molin (1998)
pMIR147	Ap ^r ; pMBL-T with a 0.7-kb PCR fragment generated with oligos 4959 <i>SphI</i> and 4959 <i>SalI</i> including the 5' end of <i>rup4959</i>	This study
pMIR149	Gm ^r ; 0.28-kb <i>HindIII-StuI</i> fragment of pMAMV10 containing <i>rup4959</i> promoter inserted into the same sites of pRU1105	This study
pMIR150	Ap ^r ; 1.6-kb <i>XmnI/SmaI</i> fragment of pMAMV1 including the 3' end of <i>rup4959</i> inserted in the right orientation regarding the 5' end of <i>rup4959</i> into <i>SmaI</i> site of pMIR147	This study
pMIR152	Ap ^r , Km ^r ; 0.95-kb km3 cassette of p34S-Km3 inserted into <i>StuI</i> site of pMIR150	This study
pMIR153	Sm ^r , Km ^r ; 3.3-kb <i>SalI</i> fragment of pMIR152 was inserted into the same site of pKNG101	This study
pMIR154	Ap ^r ; 3.3-kb <i>BamHI</i> fragment of pMAMV2 containing promoterless <i>rup4959</i> inserted into the same site of pUC19	This study
pMIR155	Km ^r ; 2.7-kb <i>EcoRI</i> fragment of pMIR154 inserted into the same site of pMBTB-2 in the right orientation to generate a transcriptional fusion P _{BAD} :: <i>rup4959</i>	This study
pMPcfab	Tc ^r ; derivative of pMP220 bearing the transcriptional fusion P _{cfab} :: <i>lacZ</i>	Pini <i>et al.</i> (2009)

^a Ap, ampicillin; *cat*, chloramphenicol acetyltransferase; Cm, chloramphenicol; Gm, gentamicin; Km, kanamycin; MCS, multicloning site; Rif, rifampin; Sm, streptomycin; Tc, tetracycline.

Table 3. Genes with altered expression in the rhizosphere (Rup4959 Ω Tc mutant vs. KT2440)

ORF (gene)	Description	Fold change	P value
Regulators			
PP3526	Transcriptional regulator AraC family	-2.4	0.074
PP4363	Sensor histidine kinase/response regulator	-2.0	0.083
Transport			
PP1051 (<i>xcpV</i>)	Type II secretion pathway protein XcpV	-1.8	0.005
PP1516	RND membrane fusion protein (efflux)	-1.7	0.012
PP4149	Peptide ABC transporter permease protein	3.7	0.033
Metabolism			
PP3163 (<i>benC</i>)	Benzoate dioxygenase ferredoxin reductase component	-1.7	0.076
PP3275 (<i>phaH</i>)	Ring-hydroxylation complex protein 3	-1.7	0.043
PP3514 (<i>hyuB</i>)	Hydantoin utilization protein B	-2.6	0.052
Secondary metabolites biosynthesis			
PP3796	Lysine-ornithine N5-oxygenase	1.7	0.023
Resistance to stress			
PP4848	Curved-DNA-binding protein DnaJ family	-1.8	0.006
Hypothetical proteins and proteins of unknown function			
PP0076	Glycine betaine-binding protein putative	-1.7	0.059
PP0974	Hypothetical protein	-2.0	0.084
PP2118	Conserved hypothetical protein	-2.2	0.025
PP2285	Hypothetical protein	-2.5	0.092
PP2323	Putative GCN5-related N-acetyltransferase	-1.9	0.083
PP3685	Hypothetical protein	2.1	0.022
PP3901	Conserved hypothetical protein	1.8	0.024
PP3975	Conserved hypothetical protein (ribonuclease L-PSP containing domain)	1.7	0.025
PP4271	Hypothetical protein	2.3	0.034
PP5148	Predicted integral membrane protein	2.2	0.072
PP5172	Conserved hypothetical protein	-2.5	0.043
PP5363	Conserved hypothetical protein	1.7	0.018
Antibiotic resistance gene			
<i>tetA</i>	MiniTn5 Tc resistance gene	2.4	0.024

Genes with fold change > 1.7 and *P*-value < 0.1 are included. An oligonucleotide for the Tc resistance gene was included in the microarrays (Yuste *et al.*, 2006). *P*-value was increased up to 0.1 because intensity variability found among chip replicates in the rhizosphere.

Table 4. Phenotypic characteristics of KT2440 and mutant derivatives overproducing c-diGMP.

Strain	Biofilm ^a	Pellicle formation	Calcofluor stained EPS	Flocculation	Wrinkly colony	Trait mutated
KT2440 WT	-	-	-	-	-	None
KT2440 (pMAMV1)	++	++	+++	+	+	None
C1R1 (pMAMV1)	-	-	+	-	-	RpoS
<i>lapA</i> (pMAMV1)	-	-	+++	+	++	Adhesin
PP2638 (pMAMV1)	++	++	+++	+	+	EPS (cellulose)
PP5084 (pMAMV1)	++	++	+++	+	+	murein
<i>algD</i> (pMAMV1)	++	++	+++	+	+	EPS (alginate)
<i>fliC</i> (pMAMV1)	++	++	+++	+	+	Flagellin
PP1776 (pMAMV1)	++	++	+++	+	-/+	LPS (O-antigen side chain)
<i>rmlA</i> (pMAMV1)	+	-	+	++ ^b	-	LPS (core)
<i>wbpL</i> (pMAMV1)	++	+	+++	+	-/+	LPS (O-antigen side chain)
PP3127 (pMAMV1)	++	++	+++	+	+	LPS
<i>galU</i> (pMAMV1)	-	-	+	++ ^b	-	LPS (core)
MN39 (pMAMV1)	ND	ND	-	-	-	Uncharacterized polysaccharide
PP5081 (pMAMV1)	++	++	+++	+	+	Type IV Pili
PP2164 (pMAMV1)	++	++	+++	+	+	PIIZ domain protein
PP4397 (pMAMV1)	++	++	+++	+	+	PilZ domain protein
<i>pssD</i> (pMAMV1)	++	++	+++	+	+	Pyoverdine

-, phenotype absent; +/- to +++; grade of the visual detection.

^aBiofilm formation in the stationary phase, after 24 h, as stained with crystal violet (qualitative data since biofilm is too robust to be quantified). Note that the wt is classified as negative for biofilm formation because the biofilm of KT2440 disaggregates in the stationary phase.

^bBig aggregates disappear after continuous growth (96 h); aggregates formed by KT2440 (pMAMV1) are more robust and irreversible.

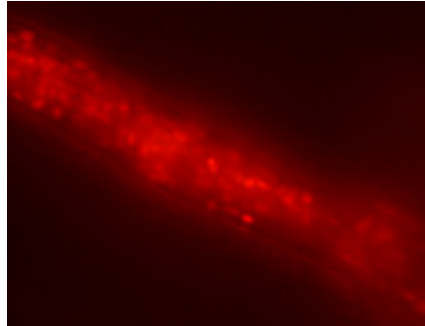


Fig. 1. $P_{rup4959}$ is active *in situ* in the rhizosphere of *Zea mays*. Root colonization by KT2440 (pMIR149) in 6 days-old plants. Image was taken with Nikon camera coupled to Zeiss Axioscope fluorescent microscope at 1000 magnification.

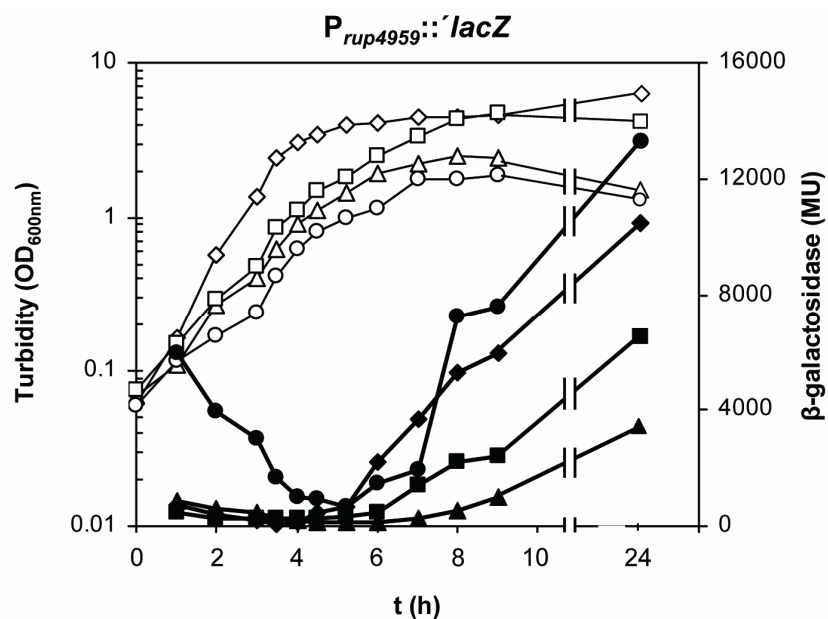


Fig. 2. Influence of culture media and growth phase on *rup4959* transcription. β -galactosidase activity (filled symbols) and growth curves (open symbols) of *P. putida* KT2440 (pMAMV12) in LB (diamonds) or M9 medium with benzoate 5 mM (circles), glucose 0.5% (squares) or citrate 15 mM (triangles) as carbon sources. Experiments were performed in triplicate with each sample measured twice. One representative experiment is shown.

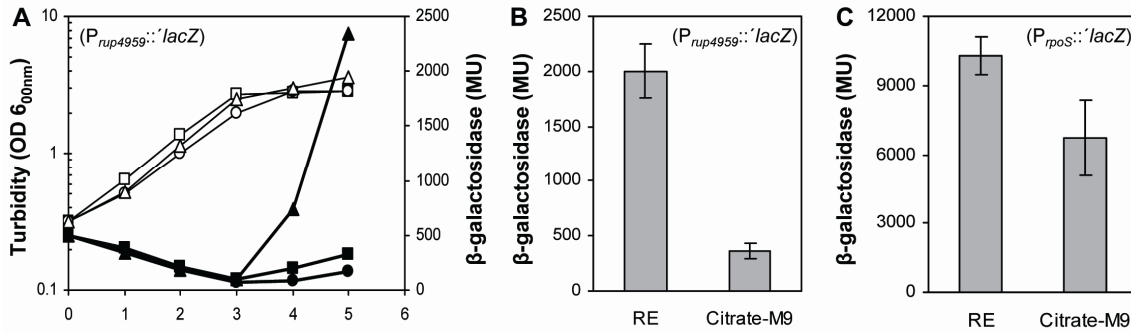


Fig. 3. Transcriptional induction of *rup4959* and *rpoS* by root exudates (RE) of *Zea mays*. Bacterial strains were cultivated in M9-citrate 15 mM. A, An overnight culture of KT2440 (pMAMV12) was diluted down to OD_{600nm} = 0.05 and, in the early exponential phase of growth, the culture was supplied with RE (triangles) collected as described in experimental procedures. Same volume of M9 salts (circles) or M9-citrate (squares) was added to the control cultures. Open symbols represent growth and filled symbols β-galactosidase activities, respectively. B and C, β-galactosidase activities measured from cultures of KT2440 (pMAMV12) and KT2440 (pMAMV21), respectively, after two hours in the presence of RE that was added at OD_{600nm} = 2. In all cases, 50 μL of forty-fold concentrated RE were added per ml of culture. Data are an average of three independent experiments and bars indicates standard deviation. Similar results were obtained using M9 salts to the control cultures.

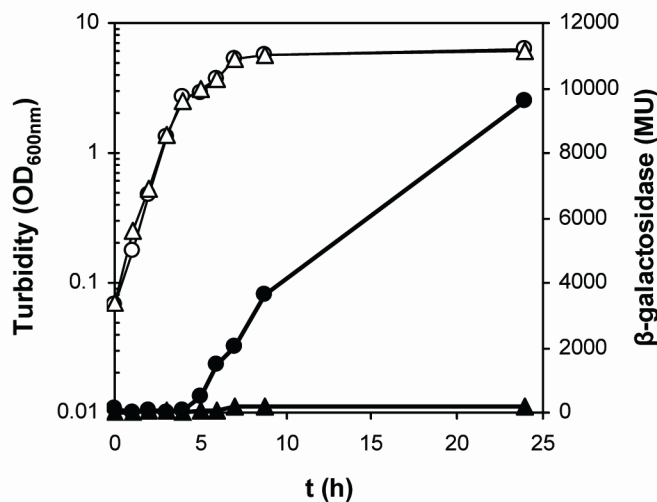


Fig. 4. Transcription of *rup4959* is completely σ^S dependent. Growth (open symbols) and β-galactosidase activity (filled symbols) of KT2440 (pMAMV12) (circles) and its *rpoS* minus derivative C1R1 (pMAMV12) (triangles) was determined in LB medium for 24 h.

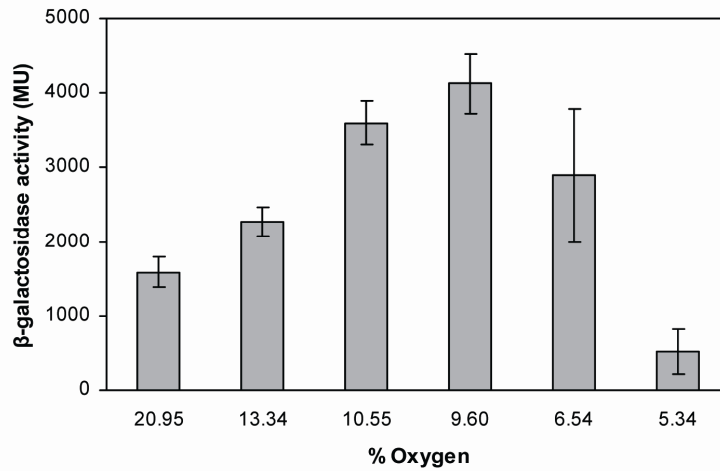


Fig. 5. Oxygen tension regulates *rup4959* transcription. Ten mL aliquots of a culture of KT2440 (pMAMV12) in M9-citrate ($OD_{600nm} = 1$) were incubated in 100 mL flasks sealed with septum caps. Appropriate quantities of N_2 were blown into the flasks to reduced oxygen down to the indicated tension. After 5 h incubation under shaking (200 rpm), β -galactosidase activity was measured. Oxygen percentage on air was determined by GC-IRMS. Data are an average of three independent experiments and bars indicate standard deviation.

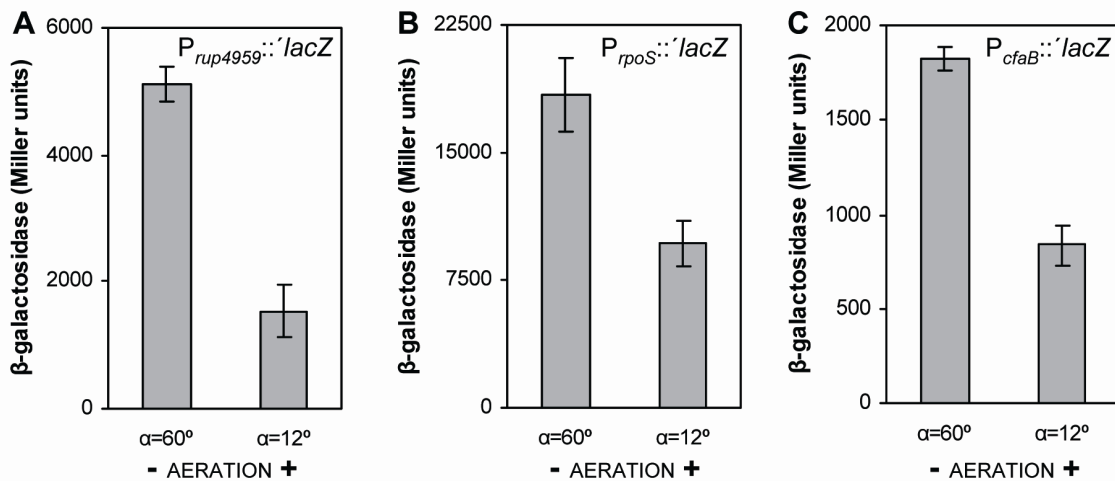


Fig. 6. Aeration conditions regulates *rpoS* transcription and other genes of its regulon. KT2440 bearing fusions $P_{rup4959}::lacZ$, $P_{cfaB}::lacZ$, and $P_{rpoS}::lacZ$ in plasmids pMAMV12, pMPcfab, pMAMV21, respectively, were grown in M9-citrate minimal medium ($OD_{600nm} = 1$). Five mL of the cultures were distributed in borosilicate tubes and incubated at two different inclination angles (α), with respect to the horizontal plane. Low ($\alpha= 60^\circ$) and high ($\alpha= 12^\circ$) aeration conditions were imposed under shaking (200 rpm). After 5 h, β -galactosidase activity was measured. Data are an average of three independent experiments and bars indicate standard deviation.

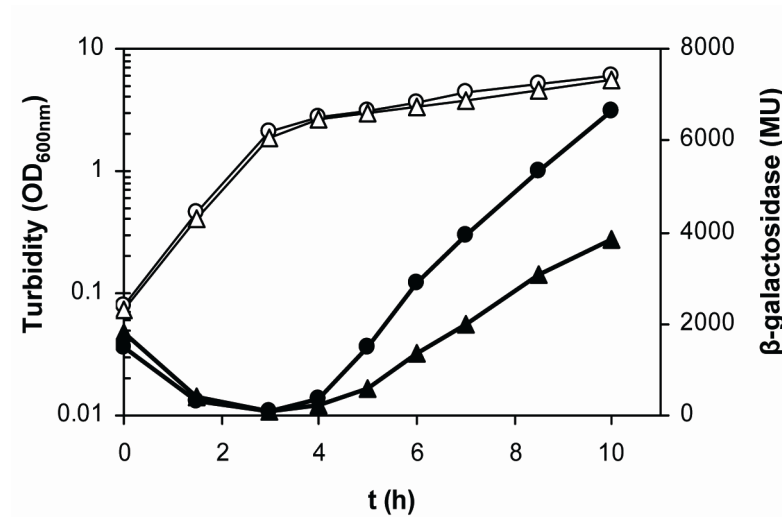


Fig. 7. Initiation of *rup4959* transcription decreases in an ANR deficient strain. Growth (open symbols) and β-galactosidase activity (filled symbols) of KT2440 (pMAMV12) (circles) and *Δanr* (pMAMV12) (triangles) were followed in LB rich medium.

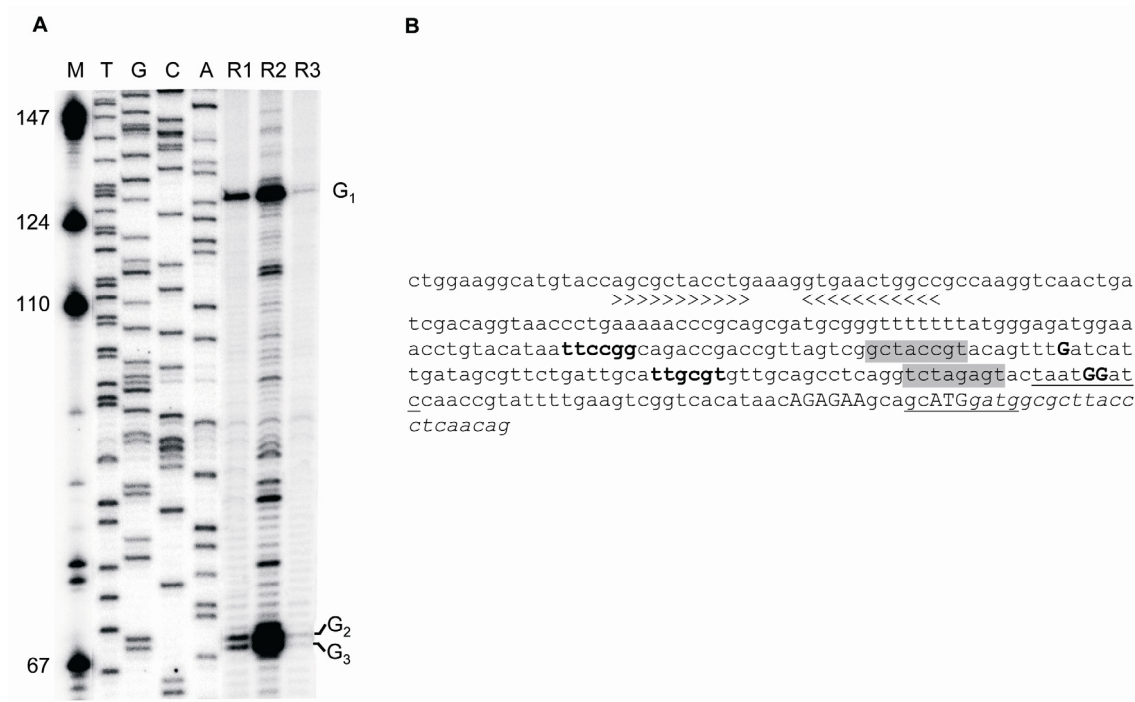


Fig. 8. Identification of the transcription start point of *rup4959* gene. A, Primer extension analysis using RNA from *P. putida* KT2440 (R1), *P. putida* KT2440 (pMAMV1) (R2) and C1R1 (R3) in stationary phase of growth ($OD_{600nm} = 3.3$). Oligonucleotide 5'-CTGTTGAGGGTAAGCGCCATC-3' was used as primer. G₁, G₂ and G₃ indicate three transcription initiation points. A, C, G, T corresponds to the sequencing ladder and line M is the molecular weight marker. Marker bands size is given on the left. B, Features in the *rup4959* promoter sequence. Pseudopalindromic sequence likely being a rho independent transcriptional terminator for PP4960 is indicated with arrowheads. Transcription initiation points are in bold in capital letters. Putative -35 sequences compatible with RpoS requirement are in bold. Oligonucleotide used is in italics letters. Sequences showing similarity to an extended -10 are in grey boxes. Shine Dalgarno (AGAGAA) and start codon (ATG) are shown in capital. Sequences compatible with the consensus of the global posttranscriptional regulator CsrA are underlined. Fragment used in the fusion $P_{rup4959}::lacZ$ expands from the initial C, located 151 nucleotides upstream of G₁, and includes the ATG of *rup4959*.

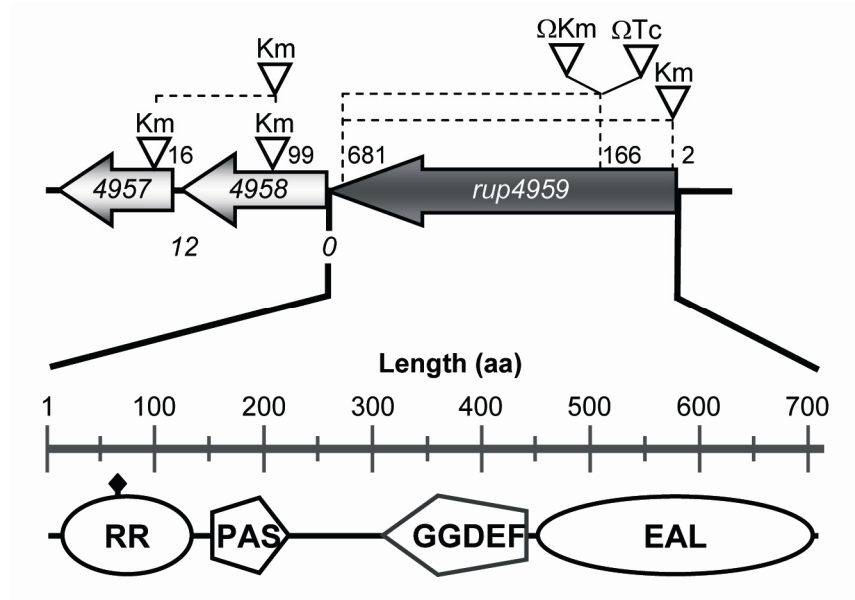


Fig. 9. Genetic organization of *rup4959-4957* gene cluster. This cluster is encoded in the minus strand. Numbers in italics show intergenic distances in base pairs. Rup4959 domains architecture derived from Pfam domain family database (Finn *et al.*, 2008) is shown. The position of the putative phosphorylation site (D₆₅) is indicated with a diamond in the receiver domain of the response regulator. Deleted fragments appear with discontinuous lines and the positions of the insertions for the Km resistance cassette, Ω Tc and Ω Km are indicated. The insertion of Ω Km and Ω Tc interposons caused polar mutations whereas the insertion of the Km cassette caused apolar mutants.

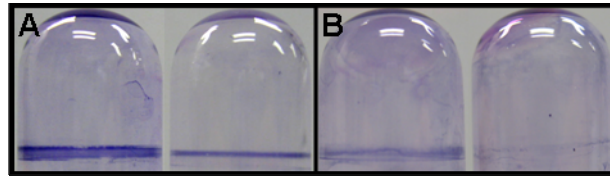


Fig. 10. Biofilm formation capacity of Rup4959ΩKm mutant under static conditions. A, *P. putida* KT2440 (left) and Rup4959ΩKm mutant (right) in borosilicate glass tubes after 24 h growing in LB, and B, in M9-glucose minimal medium supplied with CAA 0.5% (w/v). Experiments were performed in triplicate. One replicate is shown.

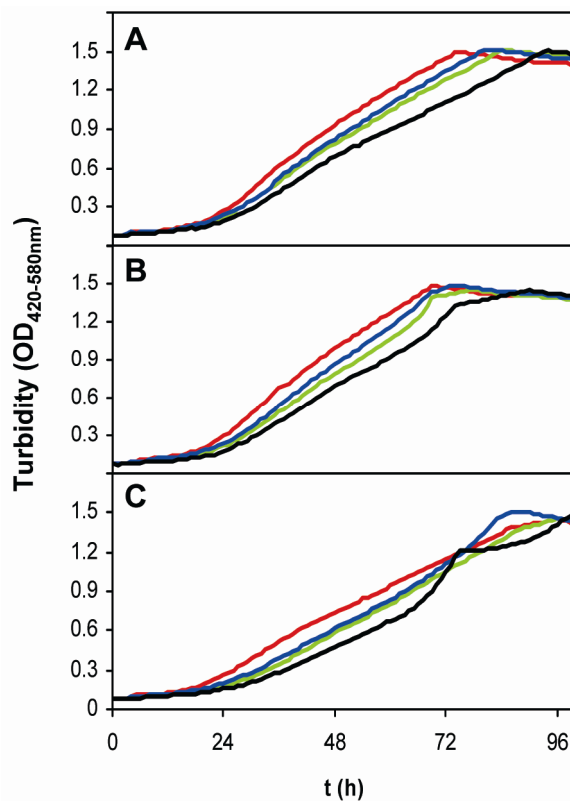


Fig. 11. Growth of *P. putida* strains with di- and tripeptides as the sole nitrogen source. Growth over the time was followed using Bioscreen Microbiological Growth Analyser (Oy Growth Curves Ab Ltd, Helsinki, Finland). Wild type KT2440 (red), and single mutant Rup4959ΩKm (black), PP4958 (blue) PP4957 (green) strains were cultivated for 100 h at 30°C under medium amplitude shake in glucose-supplied M8 minimal medium. Five mM of peptides Glycine-Proline (A), Glycine-Glycine-Alanine (B) and Glycine-Glycine-Leucine (C) were used as nitrogen sources. Data were registered each hour.

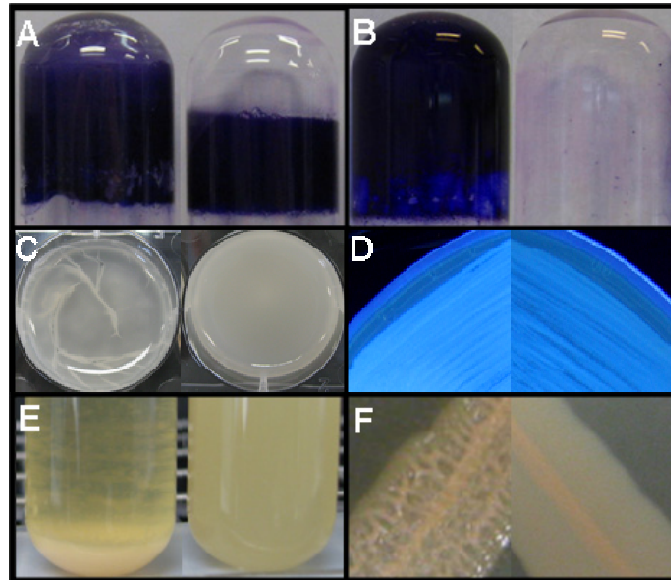


Fig. 12. *P. putida* KT2440 (pMAMV1) presents phenotypes associated with increased levels of c-di-GMP. A and B, Biofilm formation in borosilicate glass tubes after 7 and 24 h growing in LB with orbital shaking of 40 rpm, respectively. C, Formation of pellicle in polystyrene well plates with 4 mL of M9-glucose minimal medium supplied with CAA 0.5% (w/vol) after 24 h with orbital shaking of 100 rpm. D, UV detected EPS production in the presence of calcofluor, as described in the Experimental procedures section. E, Clumping of overnight LB cultivated cells following 1 h without shaking. F, Colony morphology in LB-agar after 48 h. For each panel, KT2440 (pMAMV1) is shown on the left and KT2440 (pBBR1MCS-5) on the right.

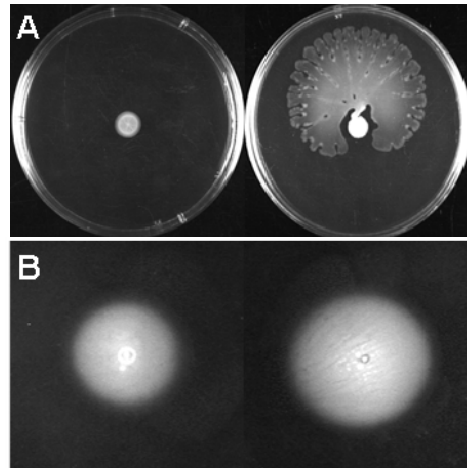


Fig 13. Decreased motility abilities of KT2440 overexpressing *rup4959*. A, To test swarming behaviour, PG-agar medium was supplied with L-arabinose 0.1% (w/vol). Two and a half microlitres of an overnight LB culture of KT2440 (pMIR155) (left) and KT2440 (pMBTB-2) (right) were laid on the centre of swarming plates, which were incubated at 25°C for 48 h. B, Swimming motility was examined in LB-agar 0.3% (w/vol) supplied with L-arabinose 0.1% (w/vol). Overnight LB cultures were adjusted to $OD_{660nm}=1$ with M9 salts and 2 microlitres inoculated on swimming plates. After 24 h incubation at 30°C the pictures were taken. Colony diameters were 28.5 ± 0.71 mm for KT2440 (pMIR155) and 37.5 ± 0.71 mm for KT2440 (pMBTB-2). Swimming and swarming of KT2440 were not affected by plasmid pMBTB-2.

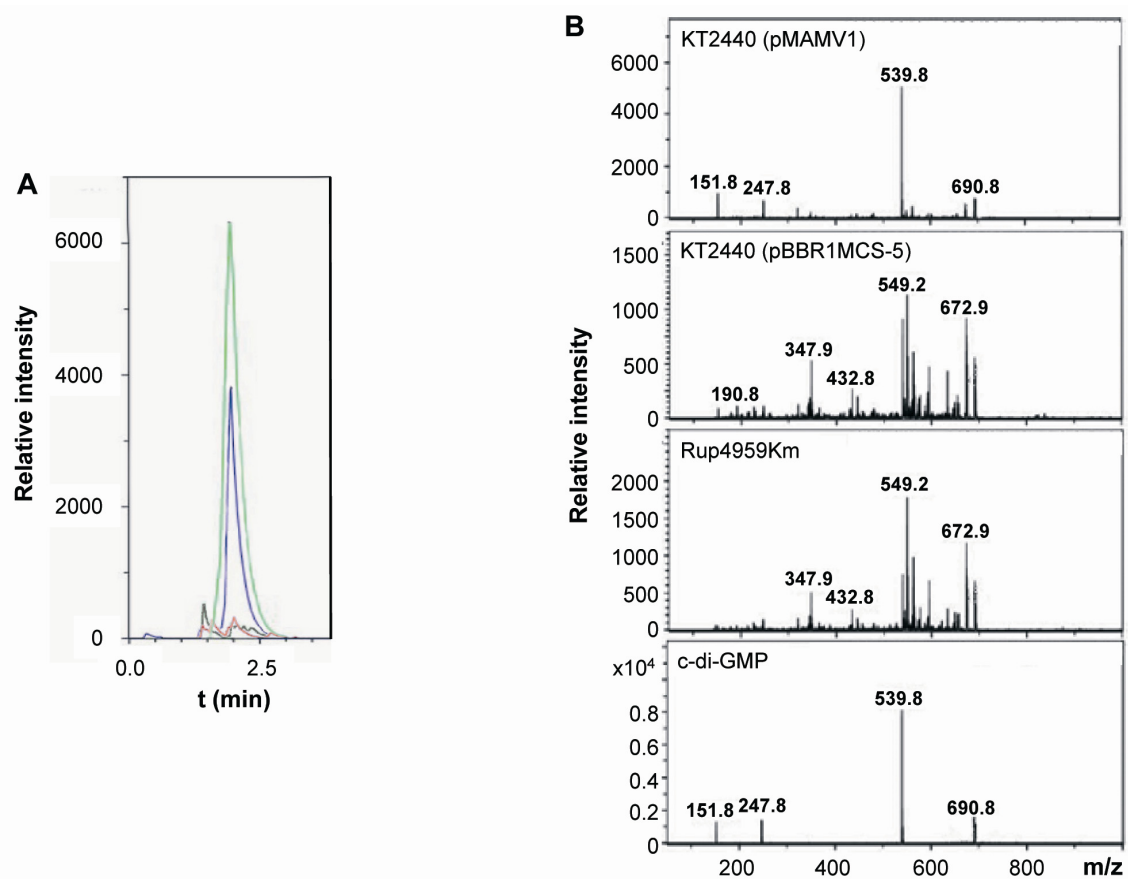


Fig. 14. Detection and quantification of c-di-GMP in *P. putida* strains by HPLC-MS analysis. A, Mass chromatograms of ion with m/z 248 present in the nucleotides fractions obtained from cellular extracts as described in the experimental procedures. Chromatogram in blue, 20 μL of a ten fold diluted cellular extract from KT2440 (pMAMV1); Chromatogram in black, 20 μL of cellular extract of KT2440 (pBBR1MCS-5); Chromatogram in red, 20 μL of cellular extract of $\Delta\text{rup4959}$ mutant; Chromatogram in green, 20 μL of a solution 1.45 μM of chemically synthesized c-di-GMP. B, ESI-MS of ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 691. Fragmentation of c-di-GMP resulted in the formation of three main ions with m/z 152, 248 and 540 like previously shown (Simm *et al.*, 2004). Mass chromatography of ion with m/z 248 was used for quantification due to specificity.

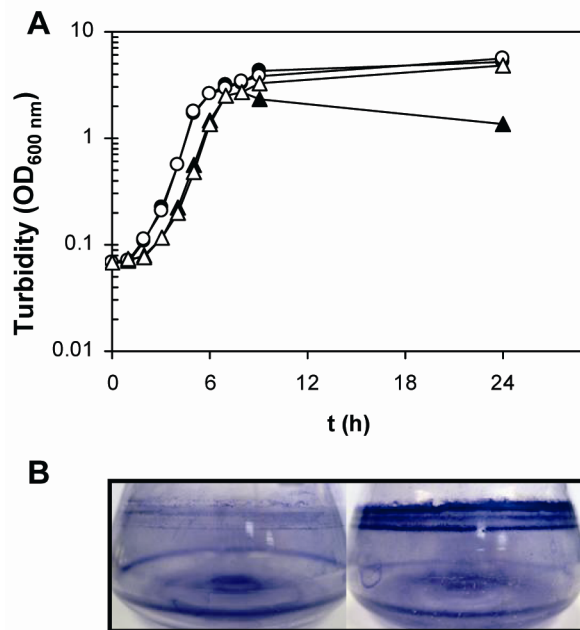


Fig. 15. Two phenotypes associated with high doses of Rup4959 require a signal occurring at stationary phase. A, Cell aggregation when the expression of *rup4959* is independent of RpoS. Growth was followed in LB control cultures (open symbols) of KT2440 (pMBTB-2) (circles) and KT2440 (pMIR155) (triangles). Cultures supplied with arabinose 0.1% appear in filled symbols. B, Earlier induced biofilm formation by addition of supernatant from a culture in stationary phase. Cells collected from an overnight culture of KT2440 (pMIR155) were washed with fresh LB and then 100 fold diluted in the same medium. This culture was incubated until late exponential phase ($OD_{600nm} = 1.5$), subsequently diluted again in LB down to $OD_{600nm} = 0.05$, and finally incubated in the presence of arabinose 0.1%. Then it was added 1 mL of free-cells supernatant (filtered, $\phi = 0.22 \mu m$) as obtained from a LB culture of KT2440 (pMBTB-2) in stationary phase ($OD_{600nm} = 3.3$) (right) or 1 mL of fresh LB medium as negative control (left).

IV. DISCUSIÓN GENERAL

La rizosfera, definida como el volumen de suelo que se encuentra bajo la influencia de la raíz, es una región que presenta variaciones continuas en sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Brimecombe *et al.*, 2007; y referencias citadas en éste). El estudio de la adaptación fisiológica de las bacterias al ambiente complejo de la rizosfera representa en la actualidad uno de los principales retos para los microbiólogos que estudian las interacciones planta-microorganismo. La búsqueda de funciones bacterianas relevantes para la colonización radicular se inició con la generación de mutantes en genes sobre los que se hipotetizaba que podrían tener un papel en colonización (Anderson *et al.*, 1988; Hawes y Pueppke, 1989; Höfte *et al.*, 1992; Matthyse y McMahan, 1998). Alternativamente, la generación de mutantes al azar y el posterior análisis de la eficiencia de los mismos en la rizosfera (De Weger *et al.*, 1987; Lam *et al.*, 1990; Dekkers *et al.*, 1998a,c; Simons *et al.*, 1996, 1997; Lohrke *et al.*, 2002), y más recientemente en la espermosfera (Espinosa-Urgel *et al.*, 2000; Yousef-Coronado *et al.*, 2008), ha sido una estrategia muy útil en la identificación de nuevos determinantes genéticos relacionados con la colonización y supervivencia. Para ampliar estos trabajos, se adaptó la tecnología IVET al estudio de la vida de los microorganismos en la rizosfera, lo que ha permitido la identificación y el aislamiento de promotores bacterianos activos preferentemente en este hábitat (Rainey, 1999; Gal *et al.*, 2003; Rediers *et al.*, 2003; Ramos-González *et al.*, 2005). El análisis con IVET permitiría, teóricamente, el análisis del genoma bacteriano completo; sin embargo, los estudios iniciales abarcaron menos del 20% del total teórico de promotores (Rainey, 1999; Ramos-González *et al.*, 2005). La utilización de la tecnología IVET resulta muy tediosa y la confirmación de los resultados "in vivo" que tiene lugar a través de la determinación de la actividad enzimática del gen reportero presente en el vector IVET, es también muy laboriosa (Espinosa-Urgel y Ramos-González, 2004). Como muestra de esta dificultad, la publicación del primer análisis completo del genoma de *P. fluorescens* con IVET en el contexto de la rizosfera (Silby *et al.*, 2009), se ha publicado diez años después de su inicio (Rainey, 1999). La tecnología IVET ha permitido identificar genes con un papel en colonización (Gal *et al.*, 2003; Zhang y Rainey, 2007), aunque éste no es el caso de todos los genes IVET (Preston *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2006).

Complementariamente, se examinó el proteoma bacteriano en presencia de ERs (Langlois *et al.*, 2003). Sin embargo, las técnicas electroforéticas empleadas en este tipo de análisis tienen una resolución limitada, debido a la dificultad para separar proteínas membrana, básicas e hidrofóbicas (Bunai y Yamane, 2005; Lee y Cooper, 2006). Con la disponibilidad de la tecnología de los "microarrays", el análisis transcripcional en la rizosfera probablemente estuvo limitado por la cantidad y calidad del ARN bacteriano. Este problema se resolvió mediante el cultivo de bacterias en ERs (Mark *et al.*, 2005). Sin embargo, este estudio presenta varias limitaciones. La primera es la utilización de exudados diluidos, con lo que la concentración de sus componentes podría reducirse por debajo del umbral necesario para alterar la expresión génica. La segunda limitación es la adición de nutrientes a los ERs para que éstos soporten un mayor crecimiento. Este enriquecimiento podría enmascarar el efecto de algún componente presente en los exudados, afectando así a los cambios transcripcionales observados (Mark *et al.*, 2005).

En esta Tesis Doctoral se ha realizado el primer análisis genómico global de una bacteria en la rizosfera (Matilla *et al.*, 2007a). Mientras que los resultados obtenidos con IVET proporcionan información sobre células individuales (Espinosa-Urgel y Ramos-González, 2004), los presentados aquí han permitido obtener una visión global de la transcripción a nivel de la población bacteriana. Es relevante destacar que las alteraciones transcripcionales observadas en nuestro estudio responden a una exudación radicular "in vivo" y a la interacción física entre la planta y la bacteria. Estas variables no se habían tenido en cuenta en el estudio de Mark y colaboradores (2005) con un cultivo planctónico de *P. aeruginosa* en presencia de ERs, ya que su sistema experimental no permite evaluar la interacción planta-bacteria "in vivo" (Mark *et al.*, 2005). Para la realización del análisis genómico con *P. putida* KT2440, hemos desarrollado la metodología requerida para recuperar las bacterias de la rizosfera, y extraer su ARN en calidad y cantidad óptimas. Tras la inoculación de las semillas con KT2440, se necesitaron seis días de incubación para obtener la cantidad de ARN necesaria para el análisis transcripcional. En ese momento, la densidad bacteriana en la rizosfera se encontraba estabilizada (mat. sup., Fig. 1S). En nuestro análisis genómico se utilizaron tres condiciones

experimentales control, que abarcaban una variedad de nutrientes, fases de crecimiento y estilos de vida (Cap. 1, Fig. 2). Resulta interesante destacar que el patrón de expresión de las bacterias rizosféricas fue más similar al de bacterias en fase exponencial de crecimiento que al de bacterias en fase estacionaria (Cap. 1, Fig. 1). Un ejemplo muy ilustrativo se obtiene al observar el perfil de expresión de los genes que codifican proteínas ribosómicas, ya que ninguno de ellos presentó una transcripción alterada en la rizosfera con respecto a las bacterias en fase exponencial. En cambio, cuarenta y nueve de estos genes ribosomales aparecieron inducidos cuando se comparó el transcriptoma de KT2440 en la rizosfera con el obtenido en fase estacionaria, lo que sugiere un elevado estado metabólico en este hábitat.

El número de estudios que analizan el estado fisiológico de las bacterias en la rizosfera es limitado. Varios autores, mediante la determinación de parámetros como la bioluminiscencia (Marschner y Crowley, 1996; Ramos *et al.*, 2000b, Roberts *et al.*, 2009), el volumen celular (Normander *et al.*, 1999), el porcentaje de células en división (Normander *et al.*, 1999), el contenido en ribosomas (Lübeck *et al.*, 2000) o el consumo de oxígeno (Roberts *et al.*, 2009), han observado que la población bacteriana en este hábitat es heterogénea. Así, aunque la actividad metabólica bacteriana en la rizosfera es mayor que en el suelo no rizosférico, gran parte de las bacterias presentan una actividad metabólica baja durante la colonización. En *P. putida* se ha evaluado la tasa de síntesis y el contenido en ribosomas como medida del estado fisiológico durante la colonización de la rizosfera (Ramos *et al.*, 2000a). Partiendo de que el contenido en ribosomas está altamente regulado y correlacionado positivamente con la tasa de crecimiento bacteriano (Wagner, 1994; Molin y Givskov, 1999; y referencias citadas en éstos), en el estudio de Ramos y colaboradores (2000a) se demostró que el contenido en ribosomas disminuía bruscamente durante el primer día de colonización en condiciones de no esterilidad, previsiblemente debido a la competición por los nutrientes con las bacterias indígenas del suelo. Sin embargo, en condiciones de esterilidad se observó que una parte de la población de *P. putida* presentaba niveles altos de actividad durante los dos primeros días de colonización. Este metabolismo elevado durante las fases iniciales de la colonización se correlacionó con la existencia de un

crecimiento bacteriano activo (Ramos *et al.*, 2000a). Por ello, nuestros resultados sugieren que las células metabólicamente activas son las que están contribuyendo mayoritariamente al ARN total empleado en nuestro análisis transcripcional (Matilla *et al.*, 2007a). De ahí que el patrón de transcripción sea más similar al de bacterias con crecimiento activo en laboratorio.

En nuestro análisis genómico, se identificaron 90 genes *rup* (del inglés, *r*hizosphere *u*p-regulated) inducidos y ninguno reprimido (Cap. 1, Fig. 2; mat. sup., Tabla 1S). La complejidad nutricional existente en la rizosfera (Newmann y Römheld, 2007; Uren, 2007; y referencias citadas en éstos) explicaría que el 17% de los genes *rup* con función conocida (Cap. 1, Tabla 1), estén relacionados con la adquisición de nutrientes procedentes de la planta. La expresión génica de las rutas implicadas en el metabolismo de estos nutrientes también se ve afectada. De este modo, un 22% de los genes *rup* con función conocida codifican proteínas relacionadas con el metabolismo (Cap. 1, Tabla 1). El hecho de que la ruta de degradación de fenilacético aparezca inducida (*rup3281*) y que se requiera para la colonización competitiva (mat. sup., Fig. 2S), sugiere que la utilización de compuestos aromáticos como fuente de carbono en la rizosfera constituye una ventaja selectiva para KT2440. Además de la adaptación nutricional, la adaptación fisiológica a las condiciones de estrés que imperan en la rizosfera tales como la presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS; Dunand *et al.*, 2007) y de compuestos antimicrobianos producidos por la planta (Perry *et al.*, 2007; y referencias citadas en éste) ha quedado puesta de manifiesto en nuestro análisis transcripcional. Así, el 16% de los genes inducidos con función conocida codifican proteínas de respuesta a situaciones de estrés y bombas de eflujo (Cap. 1, Tabla 1). Comparando nuestro estudio con el análisis IVET de *P. fluorescens* SBW25 recientemente finalizado, en este último se identificaron 125 promotores activos "in vivo" en la rizosfera de plantas de remolacha (Silby *et al.*, 2009). En este caso, la composición de los genes con función conocida fue similar a la encontrada en nuestro trabajo, excepto para aquéllos relacionados con la resistencia a estrés, cuyo porcentaje fue sensiblemente menor (8% para *P. fluorescens* frente al 16% para *P. putida*).

La identificación de genes *rup* relacionados con resistencia a distintos tipos de estrés y reparación de ADN sugiere que la rizosfera, además de ser un hábitat rico en nutrientes, también presenta hostilidades. Como ejemplo de la segunda categoría aparece el gen *rup1476*, que muy probablemente forma parte de la misma unidad transcripcional que el locus PP1477. Este locus codifica la exonucleasa RecJ, que se había identificado previamente en un estudio IVET llevado a cabo en nuestro Grupo de Investigación (Ramos-González *et al.*, 2005). RecJ interviene en procesos de recombinación homóloga (Yamagata *et al.*, 2002) y de reparación de ADN provocados tanto por radiaciones UV (Dermić, 2006) como por agentes oxidantes (Stohl y Seifert, 2006). Un mutante *recJ* está afectado en colonización competitiva (Cap. 1, Fig. 3) y en adhesión (mat. sup., Fig. 3S). Por otro lado, el hecho de que las seis copias del gen que codifica la transposasa ISPpu14 aparezcan inducidas en nuestro análisis, le adjudica un papel importante a este transposón en el contexto de la rizosfera. Es conocido que las reorganizaciones genómicas son frecuentes en la rizosfera (Espinosa-Urgel, 2004; y referencias citadas en éste) y se ha observado la presencia de las mismas en este hábitat mediadas por ISPpu10 (Ramos-González *et al.*, 2006).

La identificación de *rup0109*, que codifica una proteína de ensamblaje de la oxidasa terminal aa₃, una de las cinco oxidasas terminales que presenta KT2440 en su genoma (Morales *et al.*, 2006), sugiere un papel importante para este citocromo en rizosfera. La inducción de este gen, así como la de otros relacionados con la síntesis de citocromos (*rup3183*) y de grupo hemo (*rup0110*) propone el requerimiento de una adaptación de las cadenas de transporte a las condiciones de vida en la rizosfera, lo que explicaría que un mutante *rup0110* esté afectado en colonización competitiva (Cap. 1, Fig. 3) y en adhesión (mat. sup., Fig. 3S). La expresión de estas oxidasas terminales se ha estudiado en KT2440 y se sabe que están reguladas por la disponibilidad de oxígeno, a través de ANR (Ugidos *et al.*, 2008), por la fuente de carbono, (Dinamarca *et al.*, 2003) y por la fase de crecimiento (Morales *et al.*, 2006; Ugidos *et al.*, 2008). En nuestro análisis genómico también se han identificado un conjunto importante de genes *rup* que codifican sensores que detectan señales externas o internas (Cap. 1, Tabla 1). Dentro del primer grupo, *rup5321* codifica la proteína PhoR. El sistema

de dos componentes PhoRB está implicado en la adaptación celular a condiciones limitantes de fosfato inorgánico y se conoce que regula procesos tales como la formación de BPs (Monds *et al.*, 2007) y el metabolismo secundario de la célula bacteriana (Slater *et al.*, 2003; Solalanda *et al.*, 2003). Otro sensor es *rup4959*, que codifica el único regulador de respuesta con dominios GGDEF/EAL de *P. putida* KT2440. Estos dominios regulan los niveles intracelulares de di-GMPc. Las implicaciones de este segundo mensajero en la fisiología de KT2440 se discutirán más adelante en esta Discusión. Además de sensores, entre los genes *rup* existen genes de flagelo (*rup4359* y *rup4391*) y de quimiotaxis (*rup4987*). Previamente se ha demostrado que *P. putida* KT2440 responde quimiotácticamente a la presencia de la planta durante la colonización radicular (Espinosa-Urgel *et al.*, 2002). La importancia de la quimiotaxis para la eficiencia colonizadora de KT2440 ha quedado reflejada a través de la inactivación del operón *rup4988-4987*, ya que un mutante *rup4988* está afectado en colonización competitiva (Cap. 1, Fig. 3).

Entre los genes *rup* también se encuentra un componente de un sistema de secreción de tipo I (SSTI). *rup2560* forma parte de un clúster compuesto por los loci PP2558-2560 (mat. sup., Fig. 4S). Este SSTI es probablemente responsable de la secreción de la proteína extracelular PP2561 que, como se discutirá más adelante, tiene un papel importante en las propiedades de KT2440 como agente potencial de biocontrol (Matilla *et al.*, 2010, en prensa).

Nuestro análisis genómico ha generado una gran cantidad de datos que se han comenzado a explotar en este trabajo. Así, hemos caracterizado mutantes en genes *rup* ya existentes en la Colección de Cultivos de *Pseudomonas* (PRCC; Duque *et al.*, 2007) o bien generados en esta Tesis, en cuanto a su eficiencia colonizadora de la rizosfera en competición con la cepa silvestre. La figura 2S muestra la colonización competitiva de diez mutantes en genes *rup*, cada uno representativo de una categoría funcional. Seis de estos mutantes (*rup0110*, *rup1477*, *rup2561*, *rup3279*, *rup3283* y *rup4988*) presentaron deficiencias en la colonización competitiva de la rizosfera de maíz. En consecuencia, nuestro análisis genómico con *P. putida* KT2440 ha permitido, al igual que anteriormente el llevado a cabo con *P.*

aeruginosa (Mark *et al.*, 2005), la identificación de nuevos determinantes genéticos de colonización.

Al comienzo de esta Tesis se había demostrado la capacidad de KT2440 para proteger plántulas de maíz frente al estrés salino (Muñoz-Rojas y Ramos, 2006). Sin embargo, no se había explorado el potencial de esta bacteria como agente de biocontrol. El hecho de que se haya puesto de manifiesto la eficiencia colonizadora de KT2440 en la rizosfera de la planta modelo *A. thaliana* (Cap. 2, Fig. 2B), ha servido como punto de partida para abordar el estudio de la resistencia menos conocida dentro de los mecanismos de defensa frente a las agresiones patogénicas, como es la ISR. El estudio del potencial de KT2440 para desencadenar ISR en el sistema modelo *A. thaliana/P. syringae* pv. *tomato* se llevó a cabo durante mi estancia en el Departamento de Fitopatología de la Universidad de Utrecht, en colaboración con el Dr. P. Bakker. En un estudio, que incluyó la variedad silvestre *A. thaliana* Col-0, varios mutantes afectados en rutas de señalización (*jar-1*, *etr1* y *npr1*) y plantas transgénicas NahG, se evidenció que la colonización radicular de plantas Col-0 por KT2440 puede proteger a la parte aérea de las mismas frente a la infección posterior por una bacteria fitopatógena (Cap. 2, Fig. 1). *P. putida* KT2440 presenta la peculiaridad de que, aparentemente, activa dos rutas de señalización, la regulada por etileno/jasmónico (ISR), algo común para otras rizobacterias (van Loon y Bakker, 2005; y referencias citadas en éste), y la dependiente de ácido salicílico (SAR), de cuya activación son responsables principalmente bacterias fitopatógenas (Vlot *et al.*, 2008; y referencias citadas en éste). Aunque se ha demostrado que varias rizobacterias no patogénicas inducen la vía dependiente de ácido salicílico (SAR) (De Meyer *et al.*, 1999; Ryu *et al.*, 2003b; Tjamos *et al.*, 2005), la activación de ambas vías de resistencia (ISR y SAR) sólo se ha observado hasta la fecha con la bacteria endofítica *Micromonospora* sp. EN43 (Conn *et al.*, 2008). Actualmente no se tiene constancia de que KT2440 sea endofítica. Sin embargo, mediante microscopía electrónica de barrido se ha observado que durante la colonización de la rizosfera, KT2440 entra en contacto estrecho con la superficie de la raíz, apareciendo una película de apariencia mucilaginosa alrededor de las bacterias (mat. sup., Fig. 5S). La posibilidad de que *P. putida* KT2440 pueda activar ambas rutas de señalización proporcionaría

potencialmente a esta cepa una mayor capacidad defensiva que la que muestran otras rizobacterias que activan una sola vía (Van Wees *et al.*, 2000). Además, se podría especular con su efectividad frente a un espectro más amplio de enfermedades (Ton *et al.*, 2002).

Nuestros estudios de ISR no sólo incluyeron a la cepa silvestre KT2440, sino también a varias cepas mutantes, algunas de ellas en genes *rup* (Cap. 2, Fig. 3; mat. sup., Fig. 7S). El estudio de la capacidad de desencadenar ISR por estos mutantes ha permitido establecer una relación entre expresión génica en la rizosfera (Cap. 1), colonización competitiva (Cap. 1, Fig. 3; Cap. 2 Fig. 2) y protección frente a fitopatógenos (Cap. 2, Fig. 3; mat. sup. Fig. 7S) que nunca antes se había llevado a cabo con ninguna rizobacteria. A pesar de haber analizado varios mutantes, los resultados fueron consistentes únicamente para dos de ellos, PP2561 y PP4988, de los cuáles sólo el primero perdió la capacidad de actuar como agente de biocontrol independientemente de la densidad del inoculo inicial (Cap. 2, Fig. 3; mat. sup. Fig. 7S). El mutante PP2561 estaba afectado en colonización competitiva de la rizosfera de maíz (Cap. 1, Fig. 3) y *Arabidopsis* (Cap. 2, Fig. 2A), si bien, de forma independiente, puede colonizar la rizosfera de esta última a densidades similares a las obtenidas con la cepa silvestre (Cap. 2, Fig. 2B). Ante esta observación, es de interés mencionar que los experimentos de ISR se realizaron con semillas de *Arabidopsis* no estériles, y por tanto, en competición con bacterias indígenas. En estas condiciones, la eficiencia competitiva disminuida del mutante PP2561 sería responsable de un descenso de su densidad en la rizosfera y, de aquí derivaría su incapacidad para inducir ISR. Esta disminución en la eficiencia colonizadora puede ser consecuencia de la mayor sensibilidad frente al estrés oxidativo exhibida por este mutante (S. Santamaría, comunicación personal). El estrés oxidativo es una condición imperante en la rizosfera (Dunand *et al.*, 2007; Rudrappa *et al.*, 2007) y, por consiguiente, podría influir sobre la actividad metabólica de la cepa mutante PP2561 y, en consecuencia, sobre su supervivencia. La necesidad de un estado metabólicamente activo en la rizobacteria se ha sugerido anteriormente como un factor importante para desencadenar ISR (Han *et al.*, 2006; Djavaheri, 2007).

Aunque se conoce la existencia de cambios en el perfil de metabolitos de los ERs de plantas en respuesta a agentes biológicos, los datos disponibles en la actualidad se refieren mayoritariamente a microorganismos fitopatógenos (Walker *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2004; Bais *et al.*, 2005). La identificación de algún metabolito secundario como señal de ISR en hojas no ha tenido lugar hasta muy recientemente (Kim *et al.*, 2008). Por esta razón, nos pareció interesante estudiar el efecto de *P. putida* KT2440 sobre los exudados de *Arabidopsis* y, en el supuesto de que se produjesen alteraciones, investigar su relación con ISR a través del mutante PP2561. Este trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Dr. J. Vivanco durante la estancia de M.I. Ramos-González en la Universidad del Estado de Colorado. Tanto la cepa silvestre como el mutante PP2561 produjeron un incremento en la exudación de plantas cultivadas "in vitro" en condiciones gnotobióticas, con respecto a las plantas control (Cap. 2, Fig. 5), si bien el aumento observado fue mayor en el caso de la incubación con la cepa silvestre. Resultó muy evidente el incremento en un compuesto con tiempo de retención 11 minutos y con relación masa/carga 163 (Cap. 2, Fig. 4). Este compuesto no se detectó por HPLC en el cromatograma correspondiente de las plantas control (mat. sup., Fig. 8S). No obstante, sí que estaba presente en cantidades traza cuando se analizaron los exudados mediante espectrometría de masas (mat. sup., Fig. 8S). Esta observación y el hecho de que el compuesto no se detectara en el sobrenadante de un cultivo bacteriano (mat. sup., Fig. 8S) sugieren su procedencia vegetal. Aunque en esta Tesis Doctoral no se ha determinado la estructura de este compuesto, su espectro de absorción, con un pico a 272 nm, es compatible con la de un compuesto de naturaleza aromática (mat. sup., Fig. 9S). Varios autores han referido la presencia de compuestos aromáticos en los ERs (Kovacs, 1971; Neumann y Römheld, 2007 y referencias citadas en éste). Si la proteína extracelular con dominios peroxidasa codificada por el locus PP2561 es percibida por la planta y como consecuencia de este reconocimiento se modifica el patrón de exudación radicular es una hipótesis que habrá que demostrar. Por el momento desconocemos el mecanismo por el cuál esta peroxidasa puede ser responsable de los cambios observados en los exudados. Lo que sí se conoce es que la colonización de la rizosfera de *A. thaliana* por *P. fluorescens* WCS417r

induce cambios transcripcionales en la raíz (Verhagen *et al.*, 2004), que podrían originar alteraciones en la composición de los ERs. En resumen, nuestros resultados revelan el hallazgo de un nuevo determinante bacteriano de ISR, específico de *P. putida*. El mecanismo por el cual esta hemoperoxidasa extracelular ejerce su efecto es objeto de estudio en una Tesis Doctoral que se ha iniciado como continuación de este trabajo y que contempla tanto la purificación de la proteína como el estudio posterior de su capacidad para inducir ISR "in vitro".

El desencadenamiento de ISR requiere, en muchos casos, de una eficiente colonización de la rizosfera y para que ésta tenga lugar, una eficiente motilidad bacteriana es importante (Simons *et al.*, 1996; Dekkers *et al.*, 1998c; Capdevilla *et al.*, 2004). Incluso se han aislado de la rizosfera variantes hipermóviles de *Pseudomonas* (Sánchez-Contreras *et al.*, 2002; Achouak *et al.*, 2004), que como consecuencia de la mayor motilidad presentan una mayor eficiencia para alcanzar el ápice radicular que la cepa silvestre (Martínez-Granero *et al.*, 2006). En nuestro análisis genómico, llevado a cabo con *P. putida* KT2440, se identificaron varios genes *rup* implicados en la síntesis de flagelos (Matilla *et al.*, 2007a), lo que sugiere la importancia que tiene la motilidad, también para esta bacteria, en la colonización de la rizosfera. Sin embargo, las bacterias y en concreto *Pseudomonas*, presentan más de un tipo de motilidad en la que participan los flagelos (Toutain *et al.*, 2005; Terashima *et al.*, 2008; y referencias citadas en éste). En superficie sólida, este movimiento es de tipo "swarming" (Harshey, 2003) mientras que en medio líquido es de tipo "swimming" (Bardy *et al.*, 2003). Otros apéndices bacterianos, como los pili de tipo IV, son esenciales para el movimiento en superficie pero no para el "swimming" (Bardy *et al.*, 2003; mat. sup., Fig. 10S). Además, se han descrito mutantes en pili que están afectados en colonización (Dorr *et al.*, 1998; Böhm *et al.*, 2007). Por ser la rizosfera un ambiente heterogéneo en el que microambientes líquidos y sólidos pueden coexistir, es probable que ambos tipos de movimientos ("swarming" y "swimming") coexistan en este hábitat. La mayoría de los mutantes que se han empleado para estudiar la motilidad en la rizosfera, a través de la colonización del ápice, carecen de flagelo (de Weger *et al.*, 1987; Simons *et al.*, 1996; Dekkers *et al.*, 1998c; Capdevilla *et al.*, 2004), por lo que no se podría discriminar si las

deficiencias en colonización observadas en estos mutantes se deben a la ausencia de un tipo de motilidad u otra. Además, conviene señalar que en muchos análisis de colonización, la adhesión contribuye de manera soterrada, como ilustra el hecho de que los flagelos no sólo intervienen en la motilidad sino que también tienen un papel en la adhesión a superficies vegetales (Croes *et al.*, 1993; DeFlaun *et al.*, 1994; Turnbull *et al.*, 2001; Yousef-Coronado *et al.*, 2008). Esto sugiere la necesidad de diseñar experimentos que permitan analizar la adhesión y la colonización por separado, y así caracterizar de manera precisa la contribución que estos apéndices tienen en la colonización del sistema radicular. En este contexto es interesante mencionar que existen mutantes con apéndices íntegros aunque deficientes en el movimiento flagelar (Gorski *et al.*, 2009) o en la retracción de los pili (Böhm *et al.*, 2007) que muestran una colonización similar a la de la cepa silvestre. Sin embargo, los mutantes carentes del apéndice están afectados en colonización, probablemente como consecuencia de un fallo de adhesión, aunque este parámetro no se evaluó en estos estudios (Böhm *et al.*, 2007; Gorski *et al.*, 2009).

Al inicio de esta Tesis se desconocía que *P. putida* KT2440 presentara motilidad tipo "swarming", ni este movimiento estaba caracterizado en ninguna cepa de *P. putida*, quizá porque tiene lugar a una temperatura inferior a la que normalmente se cultiva esta bacteria en el laboratorio (Cap. 3, Fig. 1), en un medio específico y tras un periodo de inducción (Matilla *et al.*, 2007b; mat. sup. Fig. 11S). En numerosas bacterias, la producción de compuestos con propiedades surfactantes es esencial para que tenga lugar el "swarming" (Harshey, 2003; y referencias citadas en éste; Wang *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2007). Sin embargo, *P. putida* KT2440 no presenta la dotación genética para la síntesis de ningún surfactante conocido (Nelson *et al.*, 2002). Aunque en nuestro análisis genómico se identificó el gen *rup3786*, que codifica una aminotransferasa contenida en el mismo grupo génico que una sintetasa de péptido no ribosómico (Matilla *et al.*, 2007a), se descartó que este clúster fuera responsable de la síntesis de compuestos con propiedades surfactantes por comparación de la tensión superficial de un cultivo silvestre y uno mutante en este sistema. Además, el mutante *rup3786* no estaba afectado en "swarming". Curiosamente, los mutantes de flagelo mantenían la capacidad

de moverse en superficie, si bien la observación al microscopio permitió distinguir la ausencia de las características distintivas de la motilidad tipo "swarming" en estos mutantes, tales como la rotación rápida (Matilla *et al.*, 2007b).

Mediante el uso de mutantes, se han identificado algunos determinantes genéticos de KT2440 que contribuyen de forma esencial a este movimiento, tales como los pili de tipo IV (Cap. 3, Fig. 3) y los LPS, tanto el core como el antígeno O (mat. sup. Fig. 12S). La implicación de los pili (Köhler *et al.*, 2000; Kaiser, 2007; y referencias citadas en éste) y los LPS (Gygi *et al.*, 1995; Toguchi *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; Rather *et al.*, 2005) en el movimiento tipo "swarming" se ha descrito previamente. Sin embargo, al contrario de lo que acontece en *P. aeruginosa* (McGroarty y Rivera, 1990; Makin y Beveridge, 1996), *Y. pestis* (Knirel *et al.*, 2005) y *A. tumefaciens* (Arafat *et al.*, 2009), en *P. putida* KT2440 no se observó variación ni en la composición ni en la cantidad de LPS en función de la temperatura (mat. sup., Fig. 13S), por lo que la regulación del "swarming" por la temperatura no parece tener lugar a través de los LPS. Aunque en este trabajo no se ha estudiado el efecto de la temperatura sobre la expresión de los pili, tanto en *P. aeruginosa* (Termine y Michel, 2009) como en *Legionella pneumophila* (Söderberg *et al.*, 2004) su expresión disminuye con la temperatura. Es de interés mencionar que a 24 °C, que es la temperatura de incubación de los ensayos de colonización, KT2440 podría exhibir la motilidad tipo "swarming".

El fenotipo de los mutantes en "swarming" se investigó en cuanto a la interacción con la planta, por medio de ensayos de adhesión, colonización, además de analizarse también su capacidad de presentar movimiento tipo "swimming". Así, un mutante *pilD*, que carece de pili de tipo IV, es deficiente tanto en la colonización competitiva de la rizosfera como del ápice radicular (mat. sup., Fig. 14S). Sin embargo, este mutante está afectado en la adhesión a semillas (mat. sup., Fig. 15S), por lo que su baja eficiencia colonizadora puede ser el resultado de una menor adhesión inicial. Por otra parte, los mutantes *wbpL* y *wbpW*, defectivos en la síntesis del antígeno-O, aunque también están afectados en colonización competitiva de ápices (mat. sup., Fig. 14S), presentan la misma eficiencia colonizadora de la rizosfera que la cepa silvestre (mat. sup., Fig. 14S) y a diferencia del

mutante *pilD*, no están afectados en adhesión a semillas (mat. sup. Fig. 15S). A pesar del estudio pormenorizado, no se pudo concluir que la menor eficiencia para alcanzar el ápice fuera consecuencia únicamente de la deficiencia en "swarming" porque ambos mutantes *wbpL* y *wbpW* también están afectados parcialmente en "swimming" (mat. sup., Fig. 16S). Entre los mutantes en "swarming" también se encontraba el mutante *galU*, que es defectivo en la síntesis del "core" lipopolisacárido. Este mutante, que es menos eficiente en colonización competitiva que la cepa silvestre, está afectado en adhesión a semilla y parcialmente en "swimming" (Yousef-Coronado *et al.*, 2008). Aunque el papel de los LPS en la colonización de la rizosfera se había puesto de manifiesto por otros investigadores, no se habían analizado de forma independiente los procesos que contribuyen a la eficiencia en rizosfera (Simons *et al.*, 1996; Dekkers *et al.*, 1998c; de Weert *et al.*, 2006).

Un resultado interesante en la caracterización del "swarming" en KT2440 fue el requerimiento del sideróforo pioverdina, así como de su transportador FpvA o, alternativamente, de la suplementación con hierro dentro de un intervalo de concentración para que dicho movimiento tuviera lugar (Cap. 3, Fig. 6; mat. sup., Fig. 17-18S), tal y como se discute ampliamente en el Capítulo 3 (Matilla *et al.*, 2007b). El requerimiento de una concentración intracelular determinada de hierro también se ha descrito para otras bacterias. Así, un exceso del micronutriente inhibe el "swarming" en *P. aeruginosa* (Déziel *et al.*, 2003) y en *V. parahaemolyticus* (Jaques y McCarter, 2006). Por otra parte, una adquisición adecuada de hierro, mediada por el sideróforo enterobactina, es necesaria para el desarrollo de "swarming" en *E. coli* K-12 (Inoue *et al.*, 2007). Estos resultados, además de los análisis transcriptómicos llevados a cabo con bacterias que exhiben "swarming" (Wang *et al.*, 2004; Inoue *et al.*, 2007), evidencian que el estado nutricional en cuanto a hierro es decisivo en este tipo de motilidad. En la rizosfera, la biodisponibilidad de hierro puede llegar a ser limitante (Somers *et al.*, 2004; Haas y Défago, 2005; y referencias citadas en éstos). Así, diferentes estudios reflejan la importancia que para *Pseudomonas* tiene la adquisición de hierro en cuanto a su eficiencia en rizosfera (Mirleau *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2006). En *P. putida* KT2440, se requiere la adquisición de

este micronutriente para una adhesión a semillas de maíz y una colonización competitiva eficiente (Molina *et al.*, 2005; 2006).

Los estudios de la motilidad tipo "swarming" realizados con distintas bacterias sugieren que, en general, un déficit nutricional induciría este tipo de movimiento, lo que permitiría a la población bacteriana la colonización de nuevos nichos donde las condiciones nutricionales fueran más favorables (Köhler *et al.*, 2000; Déziel *et al.*, 2003). En relación a esto, *P. putida* KT2440 exhibe "swarming" en un medio limitado en nutrientes como es el PG. Por el contrario, en medios ricos como LB, no tiene lugar este movimiento. En la rizosfera existe una gran heterogeneidad espacial y temporal de nutrientes, junto con una gran competitividad por los mismos (Uren, 2007; Neumann y Römheld, 2007; y referencias citadas en éstos). Además, en los ERs se han detectado compuestos con propiedades surfactantes que reducen la tensión superficial tales como los fenoles, los ácidos orgánicos o los mucílagos (Vancura, 1964; Read y Gregory, 1997; Read *et al.*, 2003). Algunas plantas contienen en sus exudados compuestos que mimetizan moléculas señal de QS (Teplitski *et al.*, 2000, 2004; Gao *et al.*, 2003; 2007). Estas moléculas autoinductoras regulan procesos dependientes de densidad celular entre los que se encuentra la motilidad tipo "swarming" (Teplitski *et al.*, 2000). Aunque KT2440 no dispone de la información genética necesaria para la síntesis de las señales más habituales de QS, tales como las HSLs, sin embargo sí presenta un regulador con dominio de unión de estos autoinductores. Actualmente se está valorando la respuesta de esta bacteria a estas señales de QS (M. Espinosa-Urgel, comunicación personal).

Si bien no disponemos actualmente de ningún mutante que esté afectado exclusivamente en "swarming" y no lo esté en otros procesos, como adhesión o "swimming", hemos discutido que la rizosfera reúne las condiciones adecuadas para que KT2440, además de "swimming", utilice la motilidad tipo "swarming" para colonizar la rizosfera.

Sabemos que la regulación del "swarming" es dependiente de la concentración intracelular del segundo mensajero di-GMPc en *P. aeruginosa* (Kuchma *et al.*, 2007; Ryan *et al.*, 2009), *S. enterica* serovar Typhimurium UMR1 (Ryjenkov *et al.*, 2006) y *V. parahaemolyticus* (Kim *et al.*, 2007). En *P. putida* KT2440, hemos demostrado que la sobreexpresión del regulador

de respuesta Rup4959 inhibe la motilidad tipo "swarming" y tipo "swimming" (Cap. 4, Fig. 13) a través de un incremento en los niveles intracelulares de di-GMPc (Cap. 4, Fig. 14). Esta menor motilidad se ha visto reflejada en la rizosfera de modo que, cuando la concentración del segundo mensajero es alta, KT2440 no llega a colonizar los ápices radiculares de plantas maíz (mat. sup., Fig. 20S).

En las proteínas con actividad DGC se han identificado una serie de residuos conservados que son importantes para su actividad catalítica (motivo GGDEF), la regulación alostérica (motivo RxxD) y la unión a GTP y Mg^{+2} (Navarro *et al.*, 2009). A excepción de los residuos del motivo RxxD, el resto están conservados en la proteína Rup4959 (mat. sup. Fig. 21S), lo que estaría de acuerdo con su actividad DGC (Cap. 4, Fig. 14). Además de una disminución en la motilidad, varios fenotipos aparecen en KT2440 cuando se incrementan los niveles intracelulares del segundo mensajero. Entre ellos se encuentran la inducción de la formación de BPs en superficies abióticas (Cap. 4, Fig. 12A y B), la autoagregación celular (Cap. 4, Fig. 12E) y la aparición de una morfología de colonia rugosa (Cap. 4, Fig. 12F). Estos fenotipos se han observado en diferentes bacterias cuando se sobreexpresan proteínas con actividad DGC (Simm *et al.*, 2004; Hickman *et al.*, 2005; Gjermansen *et al.*, 2006; Nakhamchick *et al.*, 2008), y todos se han asociado con la formación de EPS (Yildiz y Schollnik, 1999; Solano *et al.*, 2002; Bahat-Samet *et al.*, 2004; Friedman y Kolter, 2004a,b). Utilizando el fluorocromo calcoflúor, que tiñe glucanos en los que están presentes los enlaces β (1→3) y β (1→4) glucosídico, se ha observado que la sobreexpresión de *rup4959* también causa un aumento en la formación de EPS (Cap. 4, Fig. 12D). En KT2440 se han identificado al menos cinco grupos génicos responsables de la síntesis de EPS (Tolker-Nielsen, comunicación personal). Un mutante en la síntesis de celulosa y portador de *rup4959* en multicopia, presentó una tinción con calcoflúor similar a la de KT2440 (pMAMV1) (Cap. 4, Tabla 4), como una indicación de que este EPS no es responsable del fenotipo derivado de niveles de di-GMPc elevados. Igualmente, un mutante en la síntesis de alginato presentó el mismo fenotipo pleiotrópico de la cepa silvestre a niveles elevados del segundo mensajero (Cap. 4, Tabla 4). Sin embargo, uno de los mutantes en la síntesis de EPS actualmente sin caracterizar, aunque específico de *P. putida*,

presentó una tinción con calcoflúor disminuída en las mismas condiciones, sugiriendo que la mayor tinción observada en KT2440 (pMAMV1) puede ser resultado de la sobreproducción de este EPS. Actualmente no se descarta la posibilidad de que el di-GMPc pueda inducir la síntesis o superproducción de los otros dos tipos de EPS. Curiosamente, dos mutantes defectivos en la síntesis del "core" lipopolisacárido también presentaron menor tinción con calcoflúor cuando portaban el gen *rup4959* en multicopia (Cap. 4, Tabla 4), así como una reducción en la formación de BPs y una morfología de colonias lisa (Cap. 4, Tabla 4; mat. sup. Fig. 22S). La relación entre la síntesis de LPS y EPS que establecen nuestros resultados ya había sido propuesta en *Azorhizobium* por Gao y colaboradores (2001).

P. putida KT2440 presenta cuarenta y tres genes que codifican proteínas con dominios implicados en el metabolismo de di-GMPc (Nelson *et al.*, 2002), lo que sugiere que para posibilitar el control de los niveles intracelulares de este segundo mensajero, tenga lugar una regulación precisa de la expresión de estos genes, así como de la actividad enzimática de las proteínas que codifican. Aunque el nivel de transcripción de *rup4959* fue elevado en fase estacionaria de crecimiento en todos los medios ensayados (Cap. 4, Fig. 2), el único fenotipo que se ha podido asociar con su mutación ha sido una ligera disminución en la formación de BPs en superficies abióticas en condiciones estáticas (Cap. 4, Fig. 10 A, B). En estas condiciones de menor aireación, se ha observado que la transcripción de *rup4959* es mayor (Cap. 4, Fig. 5-6; mat. sup., 23S). Tanto la existencia de regulación postranscripcional, de modo que la proteína no estaría presente en la mayoría de las condiciones ensayadas, como la carencia de actividad enzimática podrían explicar nuestros resultados. La presencia de un sitio de fosforilación en el dominio REC de Rup4959 sugiere la necesidad de un estado fosforilado para que la proteína sea activa. Este dominio REC, junto con el dominio PAS sensor, probablemente intervengan en la integración de señales intracelulares y/o extracelulares para la activación de la vía de transducción de señal mediada por este regulador de respuesta, cuyo "output" es la síntesis o degradación del segundo mensajero di-GMPc. Aunque en su gran mayoría no se han identificado las señales ambientales que controlan estas vías de transducción de señal, se ha caracterizado el control del oxígeno sobre las PDEs PdeA1 de *G. xylinum* (Chang *et al.*,

2001) y su ortólogo XC2324 en *Xcc* (Ryan *et al.*, 2007). Así, la unión de oxígeno molecular al dominio PAS de PdeA1 inhibe su actividad PDE (Chang *et al.*, 2001), y en un mutante XC2324, se pierde la regulación por oxígeno observada en la cepa silvestre para la síntesis de enzimas extracelulares (Ryan *et al.*, 2007). En adición a esto, varios son los estudios que documentan el hecho de que muchas de las proteínas responsables del metabolismo de di-GMPc regulan funciones celulares específicas bajo condiciones ambientales muy concretas (García *et al.*, 2004; Kader *et al.*, 2006; Weber *et al.*, 2006). En esta línea, conviene mencionar, que las alteraciones fenotípicas de todos los mutantes individuales de *Xcc* en 37 genes relacionados con el metabolismo de di-GMPc fueron evidentes únicamente en condiciones concretas, a excepción del mutante RpfG, que habitualmente presentó alteraciones en la producción de enzimas extracelulares, motilidad y formación de BPs (Ryan *et al.*, 2007).

La inducción de *rup4959* que se observó en el análisis genómico en la rizosfera (Cap. 1; Tabla 1) no pudo ser confirmada mediante RT-PCR cuantitativa. Tenemos previsto investigar el papel que la presencia de secuencias consenso del regulador postranscripcional CsrA, contenidas en la secuencia líder de ARNm (Cap. 4, Fig. 8), puedan tener en estos resultados aparentemente contradictorios. Dentro de nuestro estudio, conviene destacar que una fusión transcripcional a *'lacZ* presentó inducción por ERs (Cap. 4, Fig. 3) y la misma fusión a *gfp* presentó actividad en la rizosfera (Cap. 4, Fig. 1). Si bien no se han identificado en los ERs la señal/es responsable/s de la inducción de la transcripción, el efecto positivo del benzoato (mat. sup. Fig. 24S) sugiere la posibilidad de que los compuestos aromáticos presentes en los exudados (Kovacs, 1971; Kamath *et al.*, 2004; Neumann y Römheld, 2007 y referencias citadas en éste) sean los responsables de la activación transcripcional. En la rizosfera se pueden encontrar de forma habitual condiciones de estrés ácido y osmótico (Miller y Wood, 1996; Brimecombe *et al.*, 2007; y referencias citadas en éstos). En ambas situaciones de estrés se incrementan los niveles del factor de transcripción alternativo RpoS (σ^{38}) (Venturi, 2003; Klauck *et al.*, 2007; y referencias citadas en éste). Esto podría explicar que la dependencia de σ^{38} que presenta *rup4959* (Cap. 4, Fig. 4) tenga efecto bajo condiciones distintas a la fase estacionaria (Cap. 1, Tabla 1; Cap. 4, Fig. 1). Otra

situación en que se activa la transcripción de *rup4959* es en microaerobiosis (Cap. 4, Fig. 5-6; mat. sup., Fig. 23S), una circunstancia que resulta habitual en la rizosfera (Hawkes *et al.*, 2007).

El hecho de que los fenotipos relacionados con los niveles elevados de di-GMPc no se establecieran hasta que no se alcanzara la fase estacionaria de crecimiento, incluso cuando la expresión de *rup4959* estaba condicionada a la presencia de arabinosa y liberada de su dependencia de RpoS (Cap. 4, Fig. 15), constituye una evidencia fuerte de que el establecimiento de estos fenotipos requiere de una señal de QS. Los procesos de QS son frecuentes en la rizosfera debido a las altas densidades celulares que pueden llegar a alcanzarse (Steidle *et al.*, 2001; Gantner *et al.*, 2006; Wei y Zhang, 2006).

Además de la evidencia directa obtenida de la fusión de su promotor a *gfp*, las consideraciones anteriores en cuanto a expresión génica son compatibles con la expresión de *rup4959* en la rizosfera. Sin embargo, varios mutantes *Rup4959* presentan la misma eficiencia colonizadora que la cepa silvestre (mat. sup. Fig. 25-26S), a excepción del *Rup4959* Ω Tc (mat. sup. Fig. 27S). Con el objetivo de identificar posibles funciones que estuvieran alteradas en la cepa mutante, se llevaron a cabo dos análisis genómicos en comparación con la silvestre, uno en LB y otro en la rizosfera. El hecho de que las diferencias transcripcionales afectara a más genes en la rizosfera sería compatible con que este regulador de respuesta se encuentre activo en este hábitat. Gracias a la redundancia de proteínas con dominios DGC y PDE en KT2440, y a semejanza de lo que ocurre en otras γ -proteobacterias, sería posible que más de una proteína pudiera estar regulando el mismo proceso metabólico aunque bajo condiciones ambientales diferentes. Así, en ausencia de *Rup4959*, su actividad enzimática podría ser reemplazada por la de otra DGC, de modo que no se observarían alteraciones fenotípicas en la rizosfera. Algo similar había sido propuesto anteriormente en *S. enteritidis* 3934 (García *et al.*, 2004) y ha sido confirmado recientemente, de tal modo que en un mutante nulo en todas sus proteínas con dominios GGDEF, distintas proteínas con dominios GGDEF pueden restaurar un mismo fenotipo (Solano *et al.*, 2009).

A juzgar por los niveles indetectables de di-GMPc tanto en la cepa silvestre como en el mutante *Rup4959*Km, es probable que la contribución

de Rup4959 al "pool" de di-GMPc global no sea importante, y que de ahí se derive el requerimiento de la sobreexpresión del gen *rup4959* para la observación de alteraciones fenotípicas en relación a esta proteína. Estas alteraciones, como resultado de la elevación de los niveles de di-GMPc, pueden no ser representativas de los fenotipos regulados por este gen a niveles fisiológicos del segundo mensajero. Un ejemplo de esto se ha observado con la sobreexpresión de ADrA, que aumenta la concentración intracelular de di-GMPc en *S. typhimurium* (Simm *et al.*, 2004). Este incremento en los niveles del segundo mensajero origina la aparición de un fenotipo pleiotrópico caracterizado por la activación de la síntesis de celulosa, formación de BPs, agregación celular e inhibición del movimiento tipo "swimming" y "swarming" (Simm *et al.*, 2004). En cambio, a niveles fisiológicos de di-GMPc, la actividad DGC de ADrA parece ser bastante específica sobre la regulación de la síntesis de celulosa (Kader *et al.*, 2006) y la formación de BPs (García *et al.*, 2004).

En el momento de la finalización de esta Tesis Doctoral, los estudios relacionados con el papel del di-GMPc en la interacción planta-bacteria eran escasos y estaban principalmente focalizados en los procesos de virulencia del fitopatógeno *Xcc* (Dow *et al.*, 2006; He y Zhang, 2008; y referencias citadas en éstos). En general, la disminución de los niveles intracelulares de di-GMPc a través del dominio HD-GYP de la proteína RpfG implica un incremento en factores de virulencia tales como enzimas extracelulares y EPS (Dow *et al.*, 2003; Ryan *et al.*, 2006). Además, la inactivación de proteínas con dominios PilZ disminuye la virulencia de *Xcc* (McCarthy *et al.*, 2008). Otro ejemplo lo constituye el regulador PigX de *Serratia* sp. ATCC 39006, una proteína dual GGDEF/EAL cuyo mutante presenta mayor actividad pectinasa y con ella mayor virulencia (Fineran *et al.*, 2007). Fuera del ámbito de la patogénesis, cuando *Aeromonas veronii* presenta niveles elevados de di-GMPc, se ha observado una mayor adhesión a la superficie de la planta acuática *L. minor* (Rahman *et al.*, 2007).

En lo que respecta a interacciones beneficiosas en la rizosfera, los estudios que implican di-GMPc son escasos. Recientemente, mediante el empleo de la tecnología IVET en la rizosfera, se han identificado varios genes que codifican proteínas con dominios GGDEF/EAL en *P. fluorescens* SBW25 (Silby *et al.*, 2009). En esta cepa, la proteína WspR presenta

actividad DGC (Malone *et al.*, 2007) y mutantes *wspR* son defectivos en síntesis de celulosa (Spiers *et al.*, 2003), formación de biopelículas en superficies abióticas (Spiers *et al.*, 2003) y no presentan morfología de colonia rugosa (Spiers *et al.*, 2002). Su ortólogo en *P. fluorescens* F113 se ha relacionado con represión de la motilidad, al presentar un mutante *wspR* mayor motilidad de tipo "swarming" y "swimming" que el silvestre (Navazo *et al.*, 2009).

El efecto global del RR Rup4959 sobre la expresión génica de *P. putida* KT2440 constituye, hasta donde conocemos, el primer estudio que analiza el papel del di-GMPc en la rizosfera (Matilla *et al.*, 2007a; Cap. 4). Muchos aspectos quedan abiertos en esta Tesis con respecto a *rup4959*, tales como el análisis del probable control postranscripcional de la expresión génica. Asimismo se desconocen los elementos que intervienen en la vía de transducción de señal en que interviene este RR. Desconocemos si su fosforilación está mediada por alguna quinasa o si, por el contrario, el "pool" de donadores de fosfato intracelulares podrían llevar a cabo dicha fosforilación, como se ha propuesto para otros RR huérfanos de quinasas (Wolfe *et al.*, 2005). Otro aspecto interesante es el relacionado con la identificación del ligando del dominio PAS. Finalmente, la purificación de la proteína Rup4959 permitirá determinar si el dominio EAL presenta actividad PDE. Aunque dicho dominio muestra un alto grado de conservación con respecto a la secuencia consenso (Marchler-Bauer *et al.*, 2009), al analizar la secuencia del dominio EAL de Rup4959 se observó la ausencia de uno de los seis residuos que se han descrito como esenciales para la actividad PDE de la proteína modelo RocR de *P. aeruginosa* (Rao *et al.*, 2008). Además, en cuanto al "loop 6", un motivo conservado en las proteínas EAL que presentan actividad PDE (Schmidt *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2008) y que juega un papel importante en la unión de di-GMPc y en catálisis (Rao *et al.*, 2009), dos de los ocho residuos están degenerados en Rup4959 (mat. sup., Fig. 28S). Sin embargo, el dominio EAL de Rup4959 presenta íntegros los residuos de unión a di-GMPc, por lo que Rup4959, a pesar de que previsiblemente no presente actividad PDE, todavía podría unir el segundo mensajero y regular alostéricamente la actividad DGC de la proteína. La capacidad de unir di-GMPc se ha demostrado en varias proteínas que presentan dominios EAL enzimáticamente inactivos (Rao *et al.*, 2008;

Newell *et al.*, 2009; Tschowri *et al.*, 2009). La unión de di-GMPc a estas proteínas regula la formación de BPs (Rao *et al.*, 2008; Newell *et al.*, 2009; Tschowri *et al.*, 2009) y la motilidad bacteriana (Huang *et al.*, 2003). En este punto, conviene destacar que la elevación de los niveles intracelulares de di-GMPc, debido a la sobreexpresión de Rup4959, tiene un efecto inhibitorio sobre la transcripción de *rup4959* (mat. sup., Fig. 29S), sugiriendo una posible autorregulación de la expresión génica. El estudio de esta autorregulación, junto con la confirmación de la unión del dominio EAL al di-GMPc, es un objetivo que permanece abierto al término de esta Tesis. Además, desconocemos cuál es el papel que puede desempeñar este regulador en la biología de *P. putida* KT2440 en la rizosfera, aunque del análisis genómico se desprende que no parece estar relacionado con motilidad. Sin embargo, nuestro estudio ha permitido caracterizar las alteraciones fenotípicas que aparecen en condiciones de altos niveles de di-GMPc en *P. putida*. Dichas alteraciones no están mediadas por la síntesis del EPS celulosa, a diferencia de lo que acontece con *P. fluorescens* (Malone *et al.*, 2007) y *S. enterica* (Simm *et al.*, 2004). En KT2440, los LPS y otro EPS aún por caracterizar, aunque específico de especie, son dianas en este sistema de transducción.

V. MATERIAL SUPLEMENTARIO

La aparición de las figuras en esta discusión responde a su mención en la discusión general de esta Tesis Doctoral. Además, en este material suplementario también se incluyen figuras que no se mencionan en la discusión general.

ANEXO AL CAPÍTULO 1

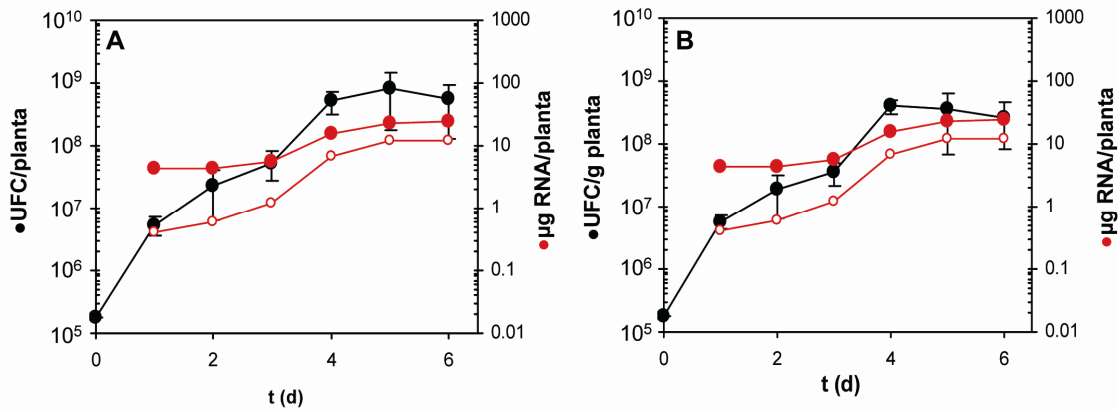


Figura 1S. Cinética de colonización de *P. putida* KT2440 en la rizosfera de plantas de maíz. Se muestra el número total de UFC en la rizosfera de plantas de maíz (A) o en relación al peso de la raíz (B), correlacionado con el ARN total extraído, antes (símbolos cerrados) y después (símbolos abiertos) de limpiarlo empleando las columnas RNeasy (Qiagen). Los gráficos muestran la media y la desviación estándar de seis plantas.

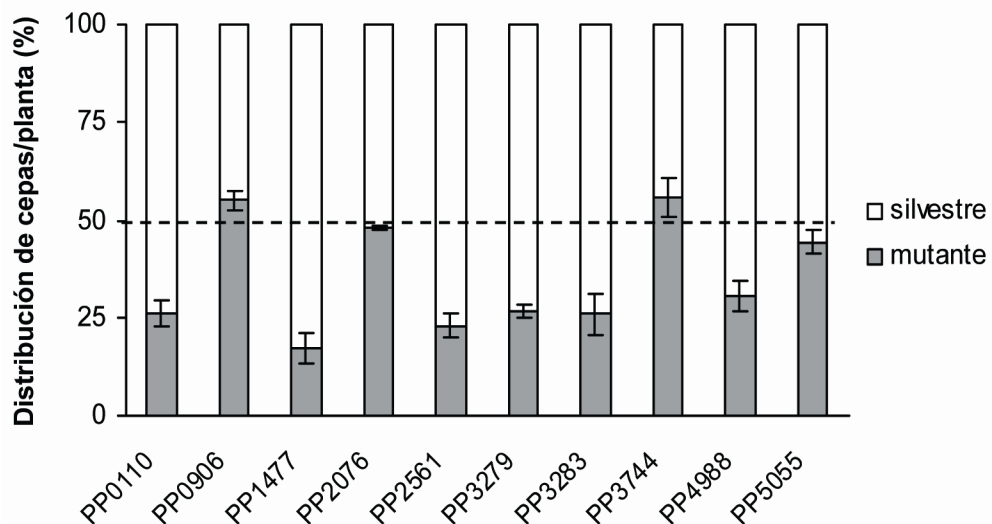


Figura 2S. Eficiencia colonizadora de la rizosfera por diferentes mutantes de *P. putida* KT2440 en competición con la cepa silvestre KT2440RTn7-Sm. Las cepas se inocularon en la misma proporción ($50\% \pm 2\%$). Doce días tras la inoculación de la semilla, las bacterias se recuperaron de la rizosfera y se contabilizaron las UFC. Cada histograma corresponde a la media y al error estándar de seis plantas.

Tabla 1S. Genes inducidos transcripcionalmente en la rizosfera de *Zea mays*.

Genes <i>rup</i> (rhizosphere up-regulated)	Riz/exp	Riz/Estac	Riz/Microcosm
PP0110 cyoE-1-protoheme IX farnesyltransferase	13.2	51.5	10.2
PP0196 -ABC transporter ATP-binding protein putative	2.4	6.7	3.7
PP0326 soxG-sarcosine oxidase gamma subunit	4.8	7.9	5.8
PP0373 -Pmp3 family protein	8.1	8.4	8
PP0374 -hypothetical protein	5.8	6.9	3.3
PP0433 -HesB/YadR/YfhF family protein	2.9	4.2	2.4
PP0670 -transporter bile acid/Na ⁺ symporter family	5.7	11.1	3.7
PP0700 -transmembrane sensor putative	21.9	50.4	26.2
PP0906 -multidrug efflux RND transporter putative	3.5	8.5	2.6
PP1066 -sigma-54 dependent response regulator	13	41.9	10.1
PP1123 -conserved hypothetical protein	3.6	8.2	3.4
PP1124 -conserved hypothetical protein	11.7	14.4	8.3
PP1271 -multidrug efflux MFS transporter putative	11.3	25.6	18.1
PP1403 bglX-periplasmic beta-glucosidase	2.5	2.9	2.5
PP1406 -hypothetical protein	9.5	20.1	19.8
PP1476 -conserved hypothetical protein	17.3	76.2	29
PP1691 -conserved hypothetical protein	4.5	11.4	3.5
PP1874 -glutathione peroxidase	4.3	7.9	5.4
PP2044 -conserved hypothetical protein	5.1	11.1	3.4
PP2127 -sensor histidine kinase	31.8	14.1	17.3
PP2153 -conserved hypothetical protein	8.3	7.2	11.2
PP2155 loID-lipoprotein releasing system ATP-binding protein	4	2.4	5.2
PP2376 cti-esterified fatty acid cis/trans isomerase	2.4	3.6	2.3
PP2385 aziC-branched-chain amino acid transport protein AziC	4	4.1	3.2
PP2447 -conserved hypothetical protein	8	8.8	8.7
PP2560 -transport protein HasD putative	23.3	60	9
PP2562 -conserved hypothetical protein	3.3	4.7	3.3
PP2565 -helicase putative	5.5	12.6	5.1
PP2666 -hypothetical protein	13.2	5.2	11.7
PP2669 -outer membrane protein putative	9.5	11.6	4.7
PP2746 -conserved hypothetical protein	11.7	21.9	9.9
PP2798 -oxidoreductase putative	15.8	50.1	26.1
PP2817 mexC-multidrug efflux RND membrane fusion protein MexC	3.8	6	2.2
PP2847 ureJ-urease accessory protein UreJ	22.9	29.6	21.9
PP2984 -hypothetical protein	12.5	8.3	3.6
PP2999 -glyoxalase family protein	14.3	19.2	7.9
PP3105 -hypothetical protein	7.9	7.6	4.8
PP3132 -polysaccharide transporter putative	3.1	3.9	2.6
PP3146 -oxidoreductase putative	12.6	11.2	10.7
PP3169 -conserved hypothetical protein	3.5	6.1	6.1
PP3183 -SCO1/SenC family protein/cytochrome c	2.9	5	3
PP3184 -hypothetical protein	6.6	3.9	3.9
PP3210 -ABC transporter permease protein	3.4	4.3	3.9

Genes rup (rhizosphere up-regulated)	Riz/exp	Riz/Estac	Riz/Microcosm
PP3223 -ABC transporter periplasmic binding protein	36.9	25.4	66.4
PP3281 -phenylacetic acid degradation protein Paal putative	6.2	8.1	8.6
PP3352 -arylsulfatase putative	36.5	17.6	49.4
PP3499 -ISPpu14 transposase Orf1	23.6	34.7	10.6
PP3535 ggt-1-gamma-glutamyltransferase	2.2	2.2	2.1
PP3547 -oxidoreductase short chain dehydrogenase/reductase family	22.5	9.9	36.3
PP3583 -RND efflux transporter permease protein	2.7	4.2	3
PP3640 -transcriptional regulator AraC family	19.7	28.9	10.3
PP3746 glcE-glycolate oxidase subunit GlcE	3.6	3.4	3.6
PP3770 -conserved hypothetical protein	4.3	13.2	15.7
PP3786 -aminotransferase	5.3	4.3	2.1
PP3802 -cation ABC transporter ATP-binding protein putative	13.8	20.1	5.2
PP3805 -conserved hypothetical protein	21.7	35.3	15.7
PP3923 -phosphoglycerate mutase family protein	4.5	4.3	2.8
PP3966 -ISPpu14 transposase Orf1	17.3	11.4	8.1
PP3979 -ISPpu14 transposase Orf1	39.8	17.1	7.1
PP4295 -transcriptional regulator TetR family	8.9	8.7	6
PP4305 -periplasmic thiosulfate-binding protein	3.2	3.8	2.7
PP4331 -conserved hypothetical protein	4.9	5.6	4.5
PP4359 fliL-flagellar protein FliL	4	4.6	2.8
PP4391 flgB-flagellar basal-body rod protein FlgB	3	5.2	5.2
PP4437 -ISPpu14 transposase Orf1	5.8	3.8	3.5
PP4441 -ISPpu14 transposase Orf1	14.1	11.4	4.3
PP4483 -basic amino acid ABC transporter ATP-binding protein	3.5	4.6	2.6
PP4508 -transcriptional regulator AraC family	3.2	2.7	3.2
PP4529 -conserved hypothetical protein	4.7	4.7	3.6
PP4556 -conserved hypothetical protein	7.4	2.7	2.7
PP4588 -nitroreductase family protein	2.6	2.3	3.3
PP4704 -conserved hypothetical protein	15.9	7.9	4.6
PP4782 thiD-phosphomethylpyrimidine kinase	8.5	5.8	5.5
PP4872 -conserved hypothetical protein	5.4	9.7	5.8
PP4959 -sensory box protein/response regulator	14.7	5.1	9.4
PP4987 -chemotaxis protein putative	6.4	7.3	4.4
PP5076 gltB-glutamate synthase large subunit	3.4	5.5	2.1
PP5152 -conserved hypothetical protein	3.8	4.5	2.2
PP5160 -conserved hypothetical protein	2.5	2.4	4.7
PP5197 ubiF-2-octaprenyl-3-methyl-6-methoxy-1 4-benzoquinol hydroxylase	6.9	3.5	5.8
PP5297 -amino acid transporter putative	6.6	8.8	6.7
PP5321 phoR-sensory box histidine kinase PhoR	10.5	9.1	9.7
hypothetical protein-pWW0 14385-16067	29	30.5	11.3
hypothetical protein-pWW0 25062-25484	3.1	4.1	2.4
hypothetical protein-pWW0 11798-12166	5.3	7	3.9
hypothetical protein-pWW0 c10663-10361	3.6	4.8	3.8

Genes rup (rhizosphere up-regulated)	Riz/exp	Riz/Estac	Riz/Microcosm
hypotheticalprotein-pWW0 c66769-66416	7.3	23.8	18
putative cointegrate resolution protein T-pWW0 c30461-29463	4.9	4.6	2.1
putative ligase-pWW0 7172-8122	20.7	38.4	43.3
xyIR-pWW0	2.6	3.9	4.2

Se muestran los genes inducidos en la rizosfera con respecto a las tres condiciones experimentales control. Todos los genes presentan un nivel de inducción superior a dos y un valor P (*p-value*) menor a 0,05.

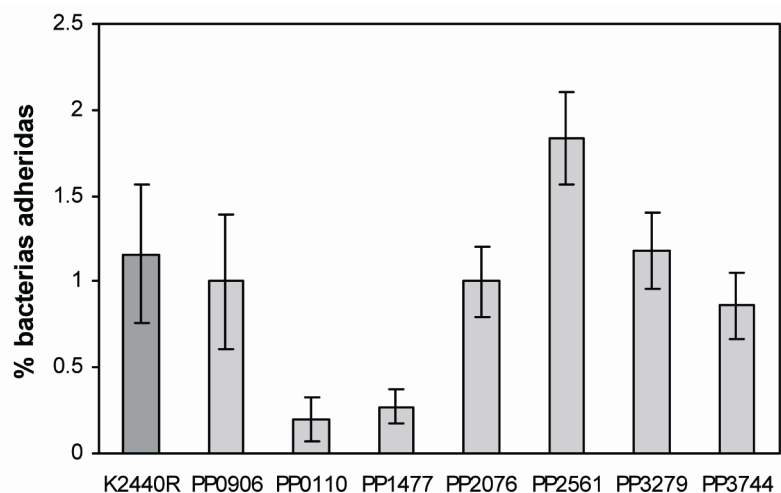


Figura 3S. Adhesión de *P. putida* KT2440 y diferentes mutantes a semillas de maíz. Los ensayos se realizaron de acuerdo con Espinosa-Urgel y Ramos (2004). Cada histograma corresponde a la media y a la desviación estándar de tres semillas.

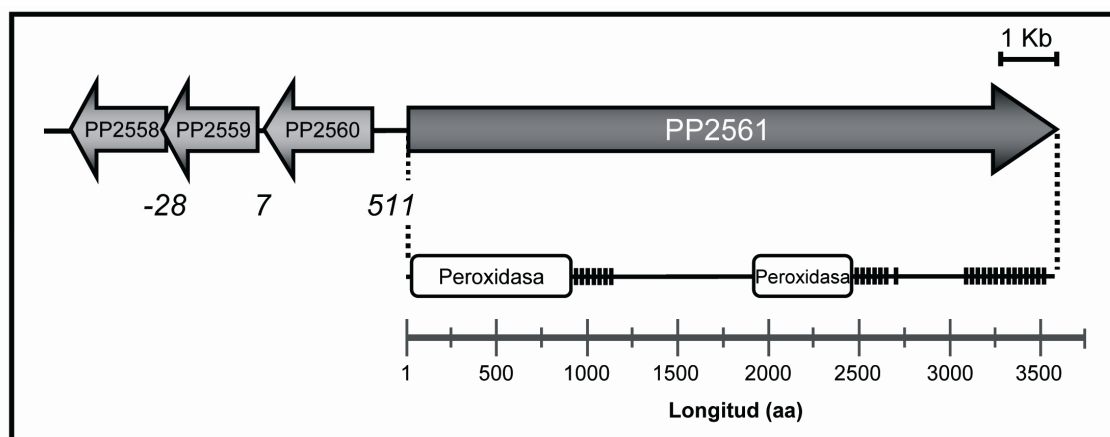


Figura 4S. Organización genética del cluster PP2558-PP2560 y del gen PP2561. Los números en cursiva indican las distancias intergénicas en pares de bases. Se muestran los dominios peroxidasa y de unión a calcio (barras negras) presentes en la proteína PP2561, derivados de la base de datos Pfam (Finn *et al.*, 2008). La anotación de estos loci, según la base de datos TIGR, es la siguiente: PP2558, "outer membrane efflux protein, putative"; PP2559, "metalloprotease secretion protein"; PP2560, "transport protein HasD, putative"; PP2561, "secreted hemolysin-type calcium-binding bacteriocin, putative".

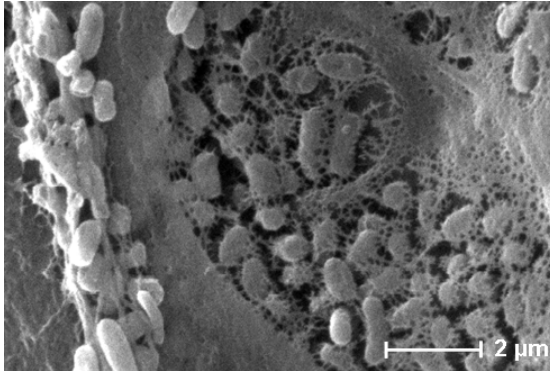


Fig. 5S. Colonización radicular de plantas de maíz por *P. putida* KT2440. Semillas estériles de maíz se inocularon con KT2440. Después de diez días, 1 cm del ápice radicular se fijó y lavó como se describe en esta sección. Se muestra una fotografía de microscopía electrónica de barrido (aumento 6000 x).

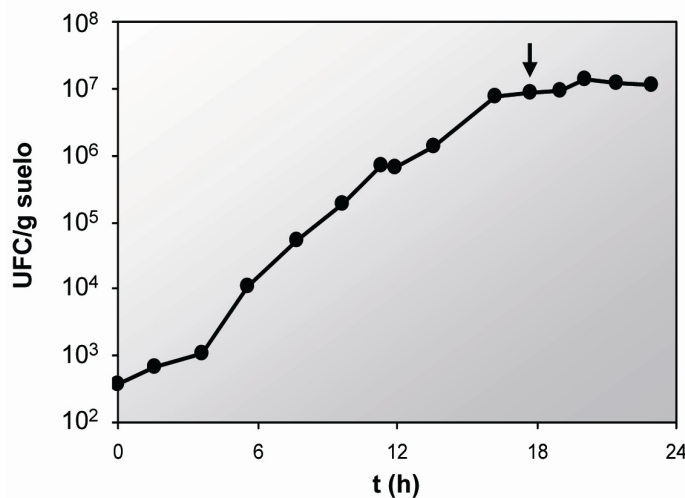


Figura 6S. Curva de crecimiento de *P. putida* KT2440 en arena de sílice (microcosmos). Cuarenta gramos de arena de sílice se inocularon con KT2440 a una densidad de 5×10^2 UFC/g. A la arena se le añadieron cuatro mililitros de solución nutritiva de plantas suplida con 15 mM de citrato sódico. El ARN utilizado en el control correspondiente en el análisis transcripcional se extrajo a partir de bacterias después de dieciocho horas de incubación en la cámara de plantas, tal y como se describe en el Capítulo 1 (Matilla et al., 2007a).

PROTOCOLO

Preparación de raíces para microscopio electrónico de barrido

Se establecieron tres regiones en la raíz de plantas de maíz de 10 días, apical, media y alta de las que se obtuvieron muestras de 1 cm. Los fragmentos de raíz se fijaron con glutaraldehído 2.5% en una solución de cacodilato sódico (0,2 M pH 7,1) durante 2 h. A continuación se lavaron dos veces en la misma solución de cacodilato durante 30 minutos. La deshidratación tuvo lugar de forma progresiva mediante incubaciones de 20 minutos en soluciones de etanol al 10, 30, 50, 70, 90 y 100%. Las muestras se pueden conservar a 4°C en etanol al 100%.

ANEXO AL CAPÍTULO 2

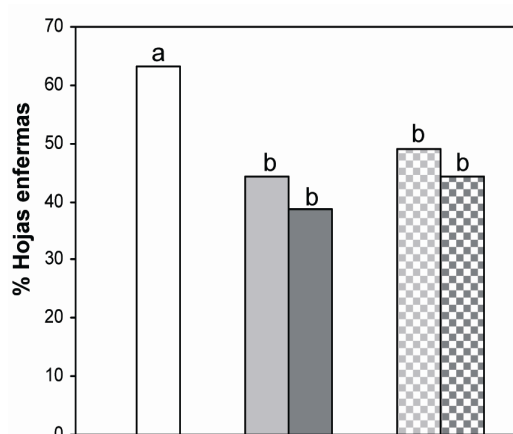


Figura 7S. Desencadenamiento de ISR por un mutante *rup* frente a *P. syringae* pv *tomate* DC3000 en plantas de *A. thaliana* Col-0. El protocolo experimental y el análisis estadístico están descritos en la leyenda de la figura 1 del Capítulo 2. Para el tratamiento, el sustrato se inoculó a una densidad final de 5×10^7 UFC/g (gris claro) y 5×10^3 UFC/g (gris oscuro) con la cepa silvestre KT2440R (liso) y el mutante PP4988 (punteado). Dichos tratamientos se compararon con las plantas control sin inocular (blanco). El mutante PP4988 deriva de KT2440R y presenta el gen marcador de resistencia a Km del miniTn5 (Matilla *et al.*, 2007a).

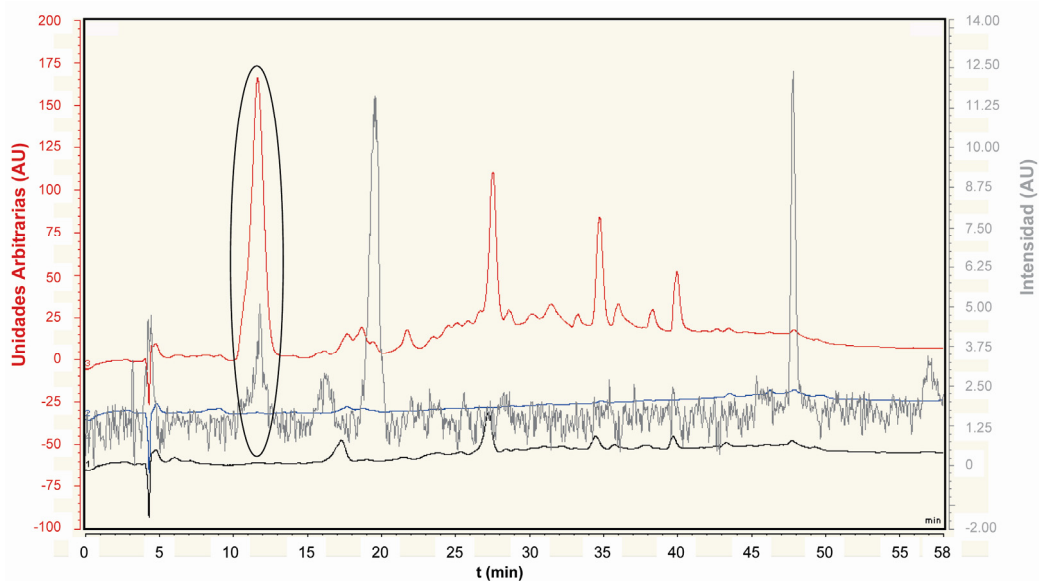


Figura 8S. Detección de cantidades traza del compuesto con relación masa/carga (m/z) 163 en exudados de plantas de *Arabidopsis*. La incubación de *P. putida* KT2440, de *A. thaliana* Col-0 y de plantas en presencia de bacterias, así como la preparación de las muestras y las condiciones de HPLC y espectrometría de masas se han descrito en el Capítulo 2. En el eje de ordenadas principal se muestran los cromatogramas de HPLC correspondientes al sobrenadante de un cultivo de KT2440 en medio MS (azul), de exudados de plantas control (negro) y de exudados de plantas en presencia de KT2440 (rojo). En el eje de ordenadas secundario se representa el cromatograma de masas para la relación $m/z = 164$ (ionización positiva) de muestras procedentes de exudados de plantas control (gris). Con un óvalo se indica el solapamiento existente entre el pico de HPLC y el TIC (del inglés, "Total Ion Chromatogram").

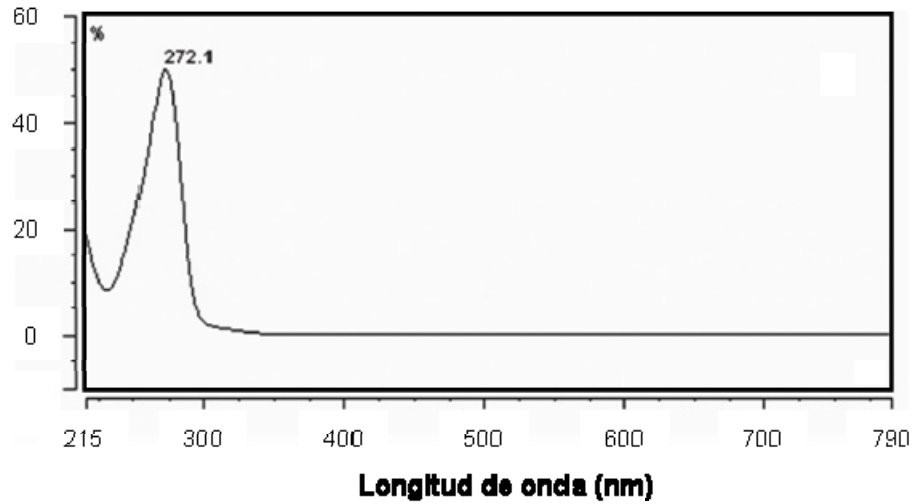


Figura 9S. Espectro de absorción del compuesto con relación carga/masa 163.

ANEXO AL CAPÍTULO 3

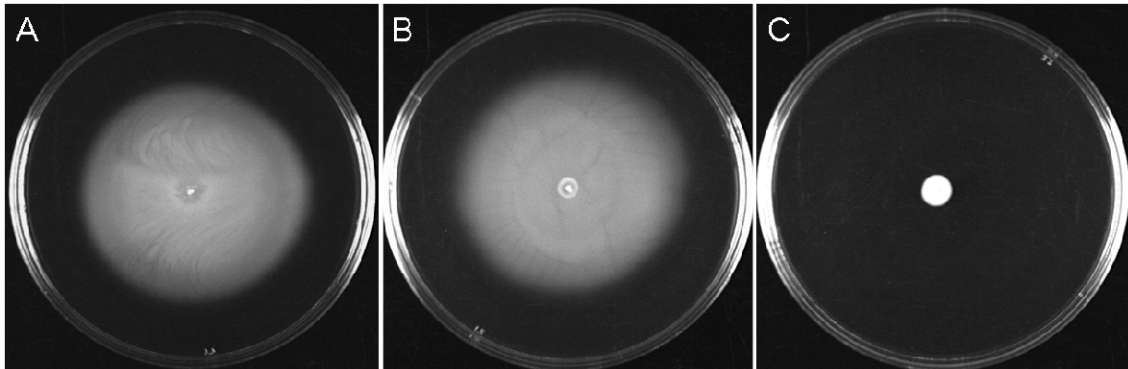


Figura 10S. Motilidad tipo "swimming" de *P. putida* KT2440 y de diferentes mutantes. Un volumen de dos microlitros de un cultivo de KT2440R (A), un mutante *pilD* (B) y un mutante *fliC* (C) en fase estacionaria, se ajustaron a $DO_{660\text{ nm}} = 1$ y se inocularon en medio LB con agar al 0,3% (peso/volumen). Las fotografías se tomaron después de 48 h de incubación a 30 °C y son representativas de tres réplicas biológicas.

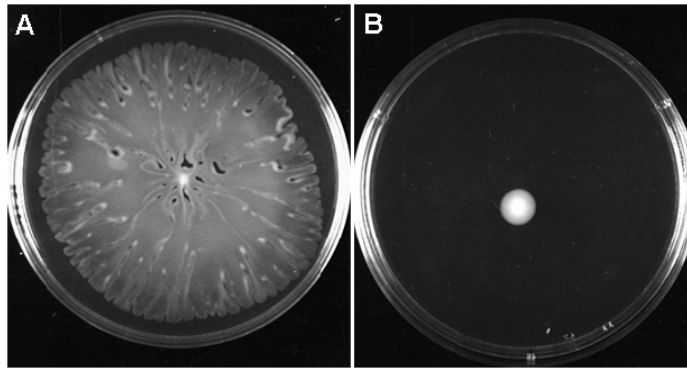


Figura 11S. *P. putida* KT2440 con movimiento tipo "swarming" activo carece de fase de latencia. Para la inoculación en A se empleó un inóculo precedente de una placa de KT2440 con "swarming" activo, mientras que en B se partió de 2,5 μ L de un cultivo en LB en fase estacionaria de crecimiento. El medio en las placas fue PG-agar (0,5%, peso/volumen). Las fotografías se tomaron después de 24 h de incubación a 25 $^{\circ}$ C y son representativas de dos réplicas biológicas y tres experimentos independientes.

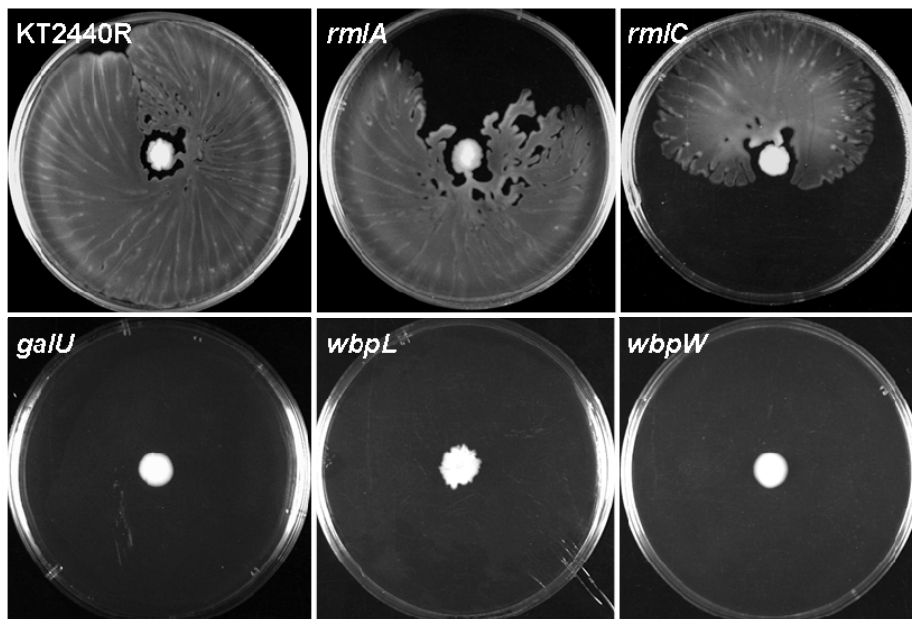


Figura 12S. Implicación de los LPS en la motilidad tipo "swarming" de *P. putida* KT2440. Un volumen de 2,5 μ L de un cultivo en LB de las estirpes de *P. putida* indicadas, en fase estacionaria, se inoculó en medio PG-agar al 0,5% (peso/volumen). Las fotografías se tomaron después de 52 h de incubación a 25 $^{\circ}$ C y son representativas de dos réplicas biológicas y tres experimentos independientes.

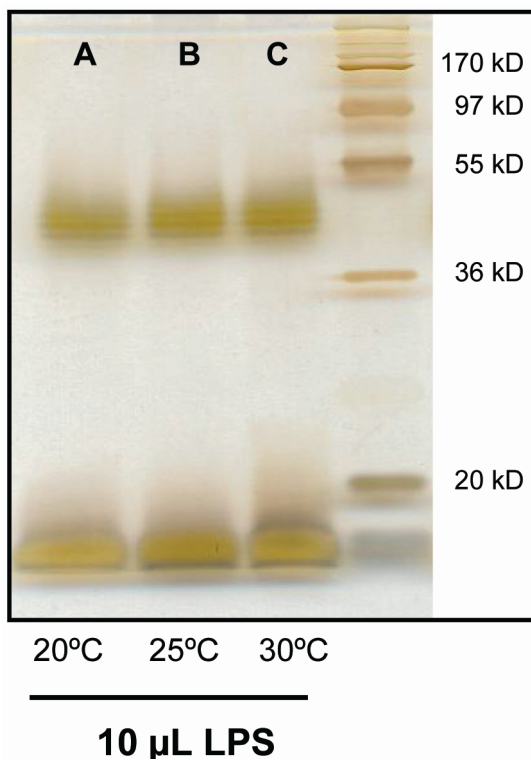


Figura 13S. Perfil de LPS de *P. putida* KT2440 a diferentes temperaturas. Cultivos líquidos en LB de KT2440 se incubaron a 20 °C (A), 25 °C (B) y 30 °C (C). La extracción de LPS se realizó a partir de 1 mL de cultivo en fase exponencial de crecimiento ($DO_{660\text{ nm}} = 0,5-0,6$) siguiendo el método descrito por Hitchcock y Brown (1983). Las muestras se ajustaron según su contenido en proteínas (Lowry, 1951). Los extractos celulares tratados con proteinasa K se separaron electroforéticamente en geles desnaturalizantes de poliacrilamida (14%, peso/volumen). El revelado del gel se realizó empleando la tinción de planta específica para LPS descrita por Hitchcock y Brown (1983) con modificaciones (ver en esta sección).

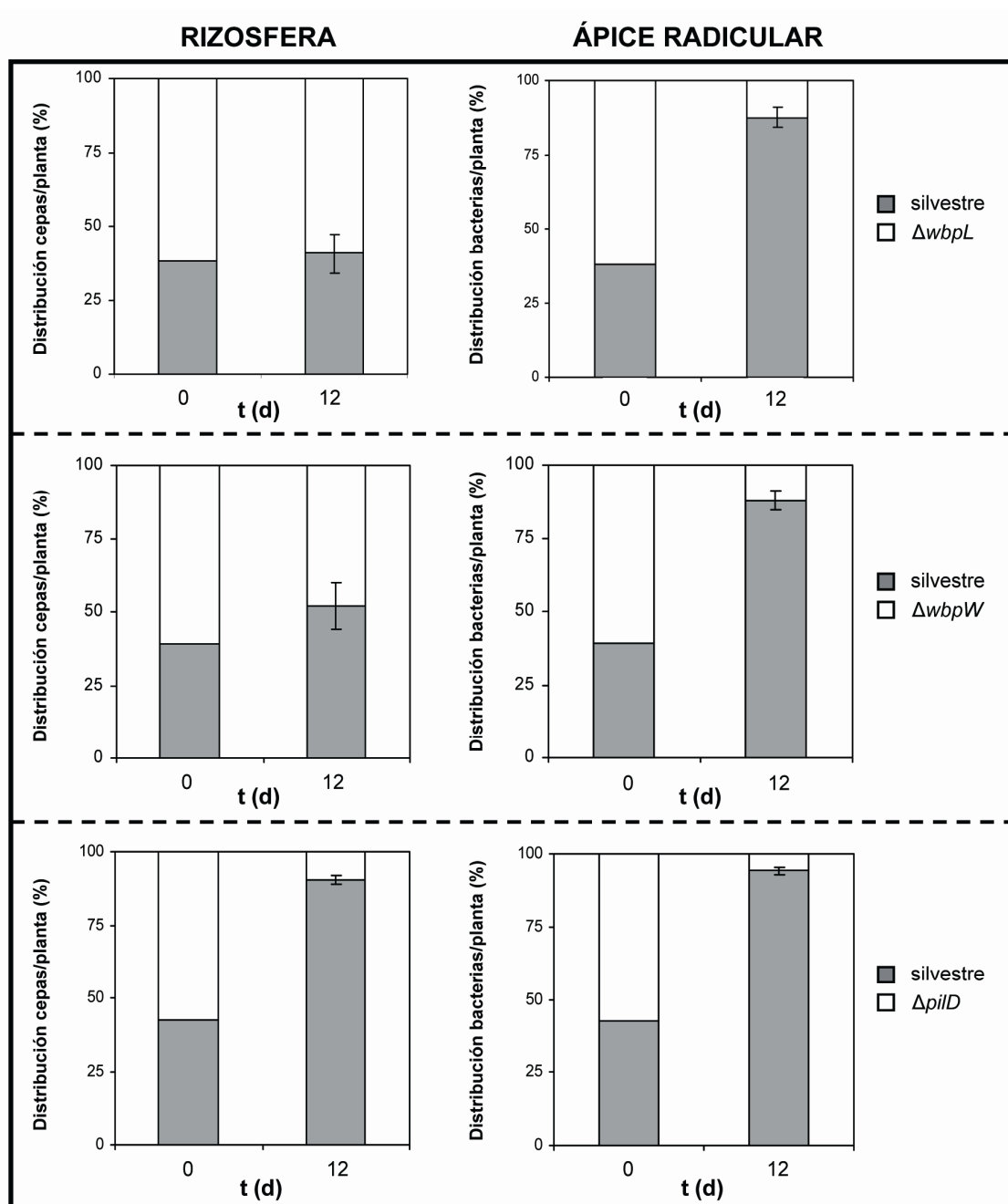


Figura 14S. Fenotipo en la rizosfera de cepas mutantes afectadas en motilidad tipo "swarming" en competición con la cepa silvestre KT2440RTn7-Sm. La esterilización e inoculación de las semillas de maíz se realizó según se ha descrito en el Capítulo 1 (Matilla *et al.*, 2007a). Las bacterias se recuperaron de la rizosfera y se contabilizaron mediante "drop-plating" doce días después de la inoculación siguiendo el protocolo descrito en el Capítulo 1. Para la cuantificación de las UFC en el ápice radicular, se cortó un fragmento de 2-3 mm del ápice correspondiente a la raíz principal de la planta y se extrajeron las bacterias mediante agitación con perlititas de vidrio. Los gráficos representan la media y el error estándar de seis plantas.

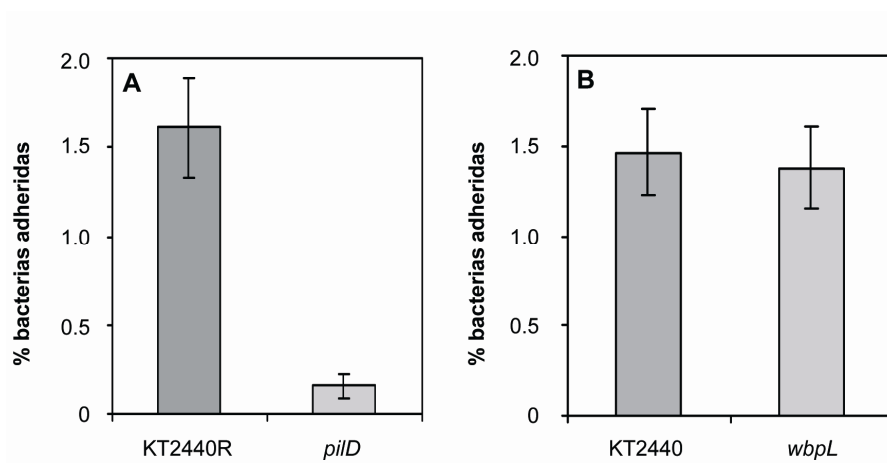


Figura 15S. Adhesión de *P. putida* KT2440 y mutantes defectivos en motilidad tipo "swarming" a semillas de maíz. Los ensayos se realizaron de acuerdo con Espinosa-Urgel y Ramos (2004). Cada histograma corresponde a la media y a la desviación estándar de tres semillas.

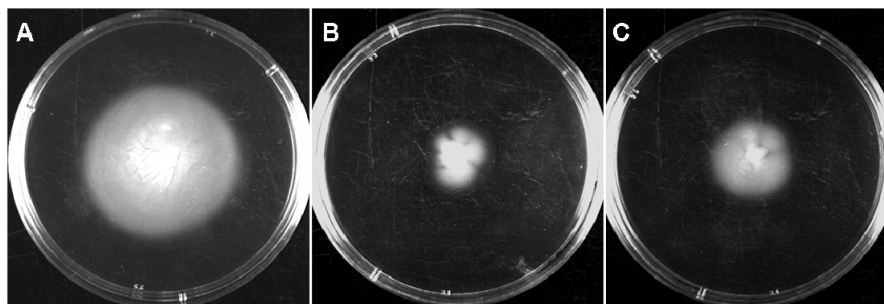


Figura 16S. Implicación de los LPS en la motilidad tipo "swimming" de *P. putida* KT2440. Un volumen de dos microlitros de un cultivo de KT2440R (A), un mutante *wbpW* (B) y un mutante *wbpL* (C) en fase estacionaria, se ajustaron a $DO_{660\text{ nm}} = 1$ y se inocularon en medio LB con agar al 0,3% (peso/volumen). Las fotografías se tomaron después de 36 h de incubación a 30 °C y son representativas de tres réplicas biológicas.

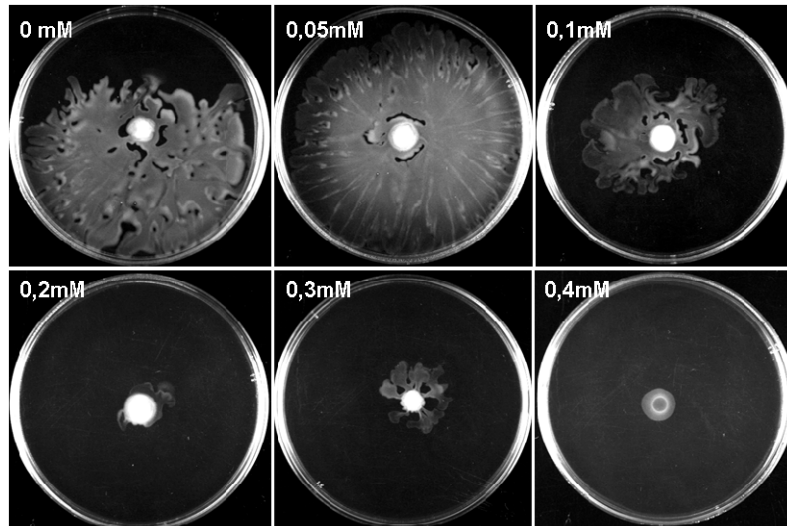


Figura 17S. Concentraciones crecientes de un quelante de hierro inhiben el movimiento tipo "swarming" en *P. putida* KT2440. Un inóculo procedente de una placa de KT2440 con "swarming" activo se inoculó en medio PG con agar al 0,5% (peso/volumen) suplido con 2,2'-bipiridina (mM; Sigma-Aldrich, número de catálogo 07-5990) a las concentraciones indicadas. Las fotografías se tomaron después de 24 h de incubación a 25 °C y son representativas de dos réplicas biológicas y tres experimentos independientes.

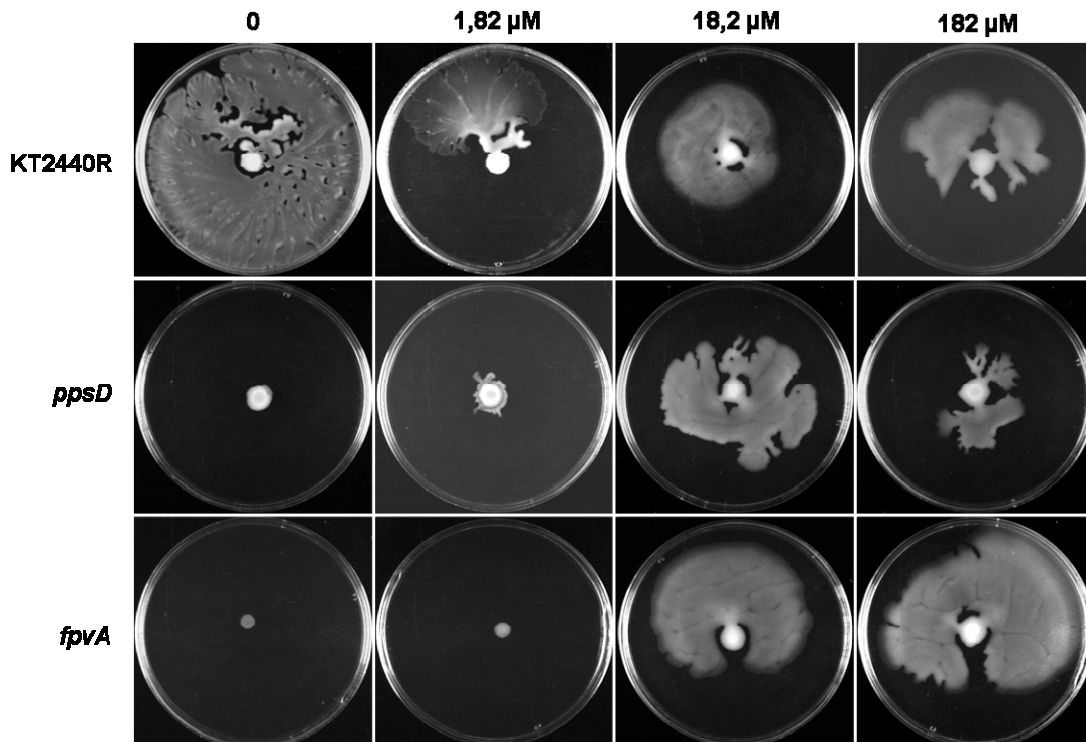


Figura 18S. Efecto del citrato férrico sobre la motilidad tipo "swarming" de *P. putida* KT2440 y los mutantes *ppsD* y *fpvA*. Un volumen de 2,5 μ L de un cultivo en LB, en fase estacionaria, se inoculó en medio PG con agar al 0,5% (peso/volumen). El medio PG-agar se suplió con las concentraciones indicadas de citrato férrico (μ M). Las fotografías se tomaron después de 55 h de incubación a 25 °C y son representativas de dos réplicas biológicas y tres experimentos independientes.

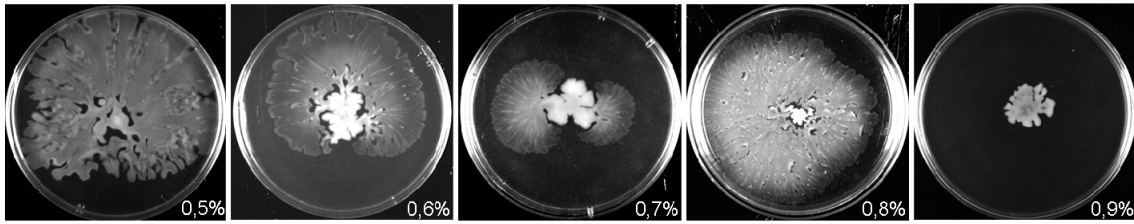


Figura 19S. Concentraciones de agar crecientes inhiben la motilidad tipo "swarming" en *P. putida* KT2440. El inóculo tuvo lugar a partir de una placa de KT2440 con movimiento "swarming" activo y se realizó en medio PG conteniendo las concentraciones de agar indicadas (% peso/volumen). Las fotografías se tomaron después de 24 h de incubación a 25°C y son representativas de dos réplicas biológicas y tres experimentos independientes.

PROTOSCOLOS

● Purificación de pioverdina

La purificación del sideróforo se realizó empleando el método descrito por Lemanceau y colaboradores (1993). *P. putida* KT2440 se cultivó durante cuatro días a 28 °C en medio succinato (Meyer y Abdallah, 1978). El sobrenadante de este cultivo se liofilizó y un líofilo equivalente a dos litros de cultivo se resuspendió en 100 mL de agua ultrapura y se ajustó a pH 7 con ácido clorhídrico. Para la precipitación de la pioverdina, la solución resultante se saturó añadiendo 72 g de sulfato amónico. Esta solución se mantuvo 16 h en agitación a 4 °C y posteriormente se centrifugó a esta temperatura durante 20 minutos a 8000 rpm. El sobrenadante se filtró dos veces utilizando papel "Whatman" número 1. Una vez filtrado, se llevaron a cabo 2-3 extracciones con fenol-cloroformo (1:1, peso/volumen). Las fases orgánicas resultantes se reunieron en un embudo de decantación a las que se añadieron 10 mL de agua ultrapura y 2,5 volúmenes de dietil éter. La mezcla se agitó vigorosamente y, tras la separación de fases, se conservó la fase acuosa que contenía la pioverdina. El proceso se repitió varias veces, añadiendo 5 mL de agua ultrapura de forma sucesiva. La solución así obtenida se liofilizó para proceder a su concentración y posteriormente se eliminaron impurezas con una columna de Sephadex G-25 (PD-10 "Desalting columns", Amersham Biosciences, número de catálogo 17-0851-01), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del sideróforo en solución se estimó utilizando el coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{400 \text{ nm, pH } 7}$) de la pioverdina producida por *P. putida* BTP16 ($18500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Jacques *et al.*, 2003). La pioverdina así obtenida con una pureza estimada del 95% se conservó liofilizada.

● Preparación de LPS y electroforesis

Para la preparación de LPS se siguió básicamente el método descrito por Hitchcock y Brown (1983). Un mililitro de un cultivo de células de *P. putida* en fase de crecimiento exponencial (DO_{660nm} entre 0,5 y 0,6) se recogió por centrifugación a 17.000 x g durante 1 min. Tras lavar el sedimento celular 1 vez con PBS, se resuspendió en 80 µL de tampón de muestra de Laemmli modificado (SDS, 2% [peso/volumen]; β-mercaptoetanol, 4% [volumen/volumen]; glicerol, 10% [volumen/volumen]; azul de bromofenol, 0,1 mg/mL; Tris-HCl, 1M pH 6,8). Las muestras se solubilizaron calentando durante 20 min a 95°C, y después se enfriaron en hielo. A cada muestra, se le añadió 20 µL de una solución de proteinasa K (2,5 mg/mL en tampón de muestra modificado), y se incubaron durante 2 horas a 60 °C. Después, las muestras se calentaron 5 min a 95 °C y se enfriaron en hielo. Los restos celulares de mayor tamaño se eliminaron centrifugando a 17.000 x g durante 3 min. Para el análisis electroforético se utilizaron 5 µL del sobrenadante. En la electroforesis, se utilizó un gel separador con 14% (peso/volumen) de poliacrilamida.

Tinción de plata específica para LPS

La tinción de plata para LPS se realizó según el método descrito por Hitchcock y Brown (1983), aunque con algunas modificaciones. Todas las incubaciones indicadas abajo se realizaron con agitación suave y a temperatura ambiente.

Tras la electroforesis, el gel se incubó durante toda una noche en una solución de fijación que contenía isopropanol 25% (volumen/volumen) y ácido acético 7% (volumen/volumen). Después, se sumergió durante 5 min en solución de oxidación recién preparada (1,05 g de ácido peryódico, 150 mL de agua destilada y 4 mL de la solución de fijación anterior). A continuación, el gel se lavó exhaustivamente 3 veces en 200 mL de agua destilada, durante 15 min cada vez, y después se sumergió durante 10 min en una solución de tinción (preparada como se indica más abajo). El gel se lavó nuevamente, al menos 4 veces en 200 mL de agua destilada, durante 15 min cada vez, y se sumergió posteriormente durante 10-20 min en una solución reveladora recién preparada (50 mg/L de ácido cítrico y 0,0185% [volumen/volumen] de formaldehído). Esta solución se debe usar a 25 °C, porque si se usa por debajo de esta

temperatura podrían revelarse las proteínas resistentes al tratamiento con proteinasa K que pudiese haber en el gel. El revelado se paró sumergiendo el gel en una solución de ácido acético al 5% (volumen/volumen) durante 15 min. Finalmente, el gel se lavó varias veces con agua destilada.

Para la preparación de la solución de tinción (ésta se preparó justo antes de usar y se protegió de la luz), se mezclaron 28 mL de NaOH 0,1 N con 1 mL de NH₄OH al 29,4% (volumen/volumen) y 115 mL de agua destilada. A esta mezcla en agitación, se le añadió muy lentamente, para prevenir la formación de precipitados, AgNO₃ 20% (peso/volumen) (aproximadamente 5 mL) hasta que la solución comenzó a saturarse. Entonces se le añadieron unas gotas de NH₄OH al 29,4% (volumen/volumen) hasta que la solución se aclaró por completo. Es fundamental que el NH₄OH concentrado esté en buen estado para obtener una tinción preferencial de los LPS.

ANEXO AL CAPÍTULO 4

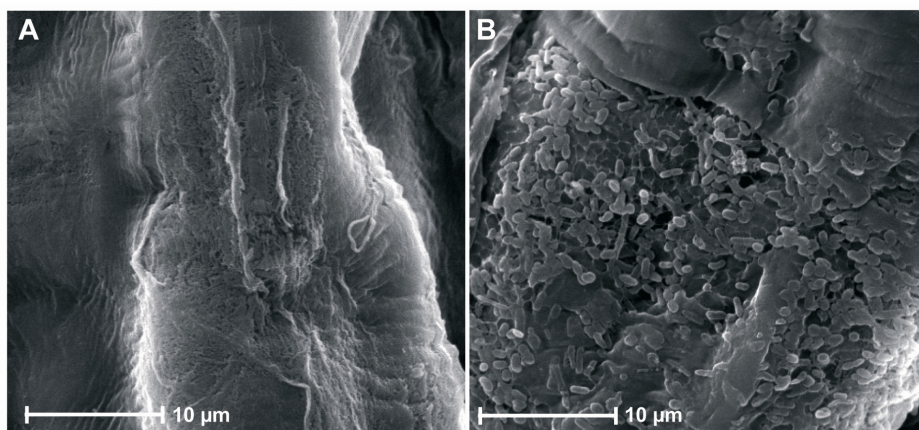


Figura 20S. Concentraciones intracelulares elevadas de di-GMPc afectan negativamente la colonización del ápice radicular de plantas de maíz. Semillas estériles de maíz se inocularon con *P. putida* KT2440 (pMAMV1) (A) y *P. putida* KT2440 (B). Después de diez días, 1 cm del ápice radicular se fijó y lavó como se describe en la leyenda de la figura 5S. Se muestran fotografías de microscopía electrónica de barrido (aumento 2000 x).

	Unión de GTP/Mg ²⁺	Sitio I	Motivo GGDEF	Unión de GTP
WspR	DVDYFKSYNDTFGHVAGD	RSSDLAARY	GGEEF	AKNNGR
PleD	DIDFFKKINDTFGHDIGD	RAIDLPCRY	GGEEF	AKASGR
Rup4959	DLDGFKRINDSLGHDAGD	GSEALLARM	GGDEF	AKQAGR
AdrA	DIDHFKSINDTWGHDAGD	RGSDIIGRF	GGDEF	AKNAGR
ScrC	DLDHFKQINDSMGHFVGD	RKTDLLARI	GGDEF	VKQDGR
FimX	HLNGYPSLQADHGLSGID	GEEADLARF	GDSIF	AARKGG
	* • •		*	•

Figura 21S. Residuos críticos en los motivos conservados en proteínas con dominios GGDEF. Las secuencias aminoacídicas de los dominios GGDEF de distintas proteínas se alinearon usando el programa "ClustalW2" (EBI). Los residuos coloreados intervienen en la unión a nucleótidos (di-GMPc y GTP). Se muestran también los residuos implicados en la unión a magnesio (*) y GTP (•). Se ha demostrado actividad DGC en las proteínas PleD (Paul *et al.*, 2004), WspR (Hickman *et al.*, 2005) y AdrA (Simm *et al.*, 2004) y ScrC (Ferreira *et al.*, 2008). FimX carece de actividad DGC (Kazmierczak *et al.*, 2006). Inspirado en Navarro y colaboradores (2009).

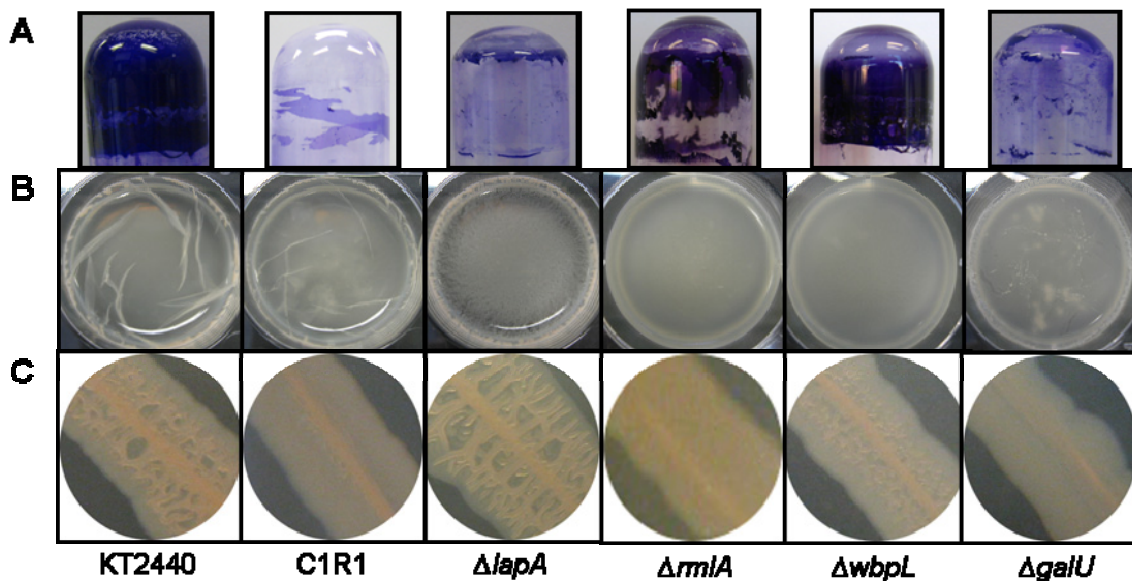


Figura 22S. Caracterización fenotípica de *P. putida* KT2440 y diferentes cepas mutantes, todas portadoras del plásmido pMAMV1. Las fotografías ilustran la tabla 2 del Capítulo 4. A, formación de biopelículas en superficies abióticas (tubos de borosilicato); B, formación de biopelículas en la interfase líquido-aire en placas de seis pocillos de poliestireno; C, morfología de colonias rugosa.

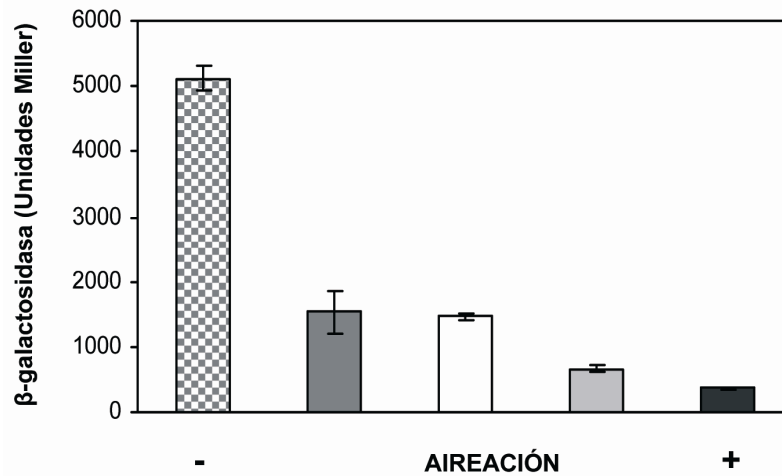


Figura 23S. La transcripción del gen *rup4959* disminuye con la aireación. KT2440 (pMAMV12) se cultivó hasta $DO_{600\text{ nm}} = 1$ en medio M9-citrato 15 mM. Tubos de borosilicato (150 x 20 mm) conteniendo 5 mL de cultivo se incubaron a diferentes inclinaciones con respecto al plano horizontal, formando un ángulo α de 60° (punteado) ó 12° (gris oscuro). Alternativamente, 10 mL de cultivo a $DO_{600\text{ nm}} = 1$ se distribuyeron en matraces de 100 mL (blanco), 250 mL (gris claro) y 500 mL (negro). Todos los cultivos se incubaron en agitación orbital a 200 rpm. La actividad β -galactosidasa se midió después de 5 h de incubación. El gráfico muestra la media de tres experimentos con dos réplicas biológicas y la desviación estándar.

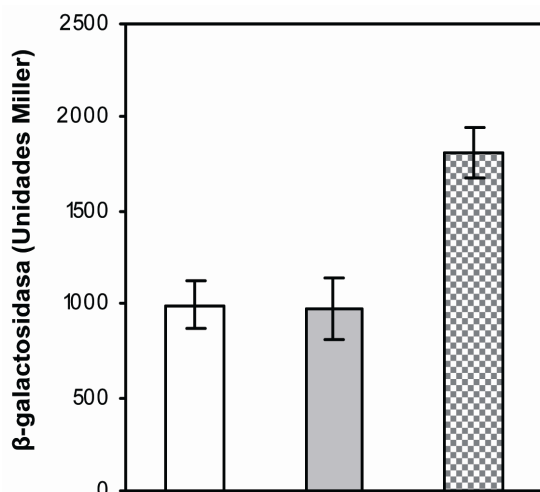


Figura 24S. Inducción por benzoato de la transcripción del gen *rup4959*. *P. putida* KT2440 (pMAMV12) se cultivó en medio M9-citrato 15 mM. Cuando el cultivo alcanzó una $DO_{600\text{ nm}} = 1$, se añadió benzoato (punteado) ó 3 metil-benzoato (gris), a una concentración final de 1 mM. El cultivo control se suplió con el volumen correspondiente de 1x M9 (blanco). La actividad β -galactosidasa se midió después de 5 h de incubación en agitación (200 rpm). El gráfico muestra la media de tres experimentos con dos réplicas biológicas. Las barras de error indican la desviación estándar.

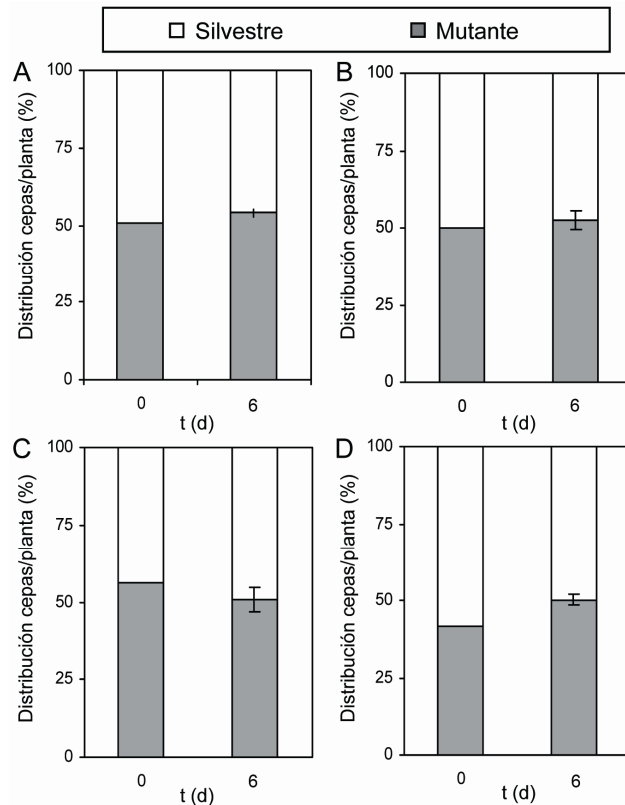


Figura 25S. Fenotipo en la rizosfera de diferentes mutantes del operón *rup4959-4957* en competición con la cepa silvestre KT2440RTn7-Sm. La esterilización e inoculación de las semillas y la recuperación de las bacterias de la rizosfera se realizó según se ha descrito en el Capítulo 1. Los gráficos muestran la eficiencia colonizadora de los mutantes Rup4959ΩKm (A), PP4957 (B), PP4958 (C) y el doble mutante PP4958-4957 (D). Los histogramas representan la media y el error estándar de seis plantas.

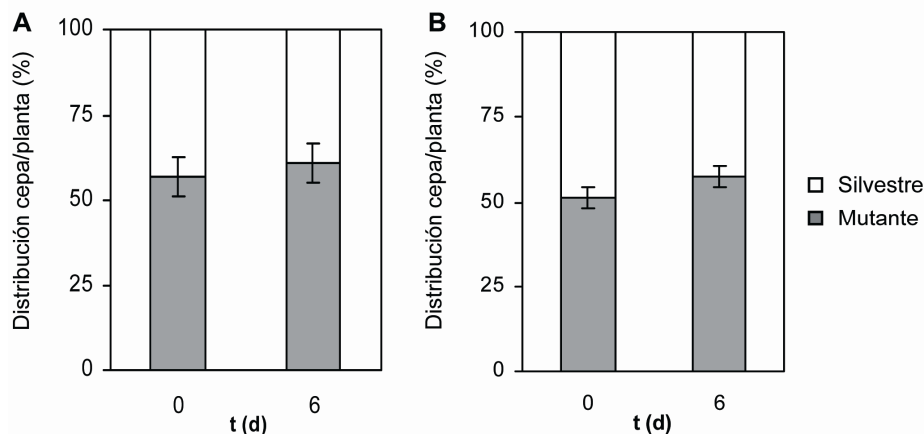


Figura 26S. Eficiencia colonizadora del ápice radicular por cepas mutantes en Rup4959. La esterilización de las semillas de maíz se realizó según se ha descrito en el Capítulo 1 (Matilla *et al.*, 2007a). Dichas semillas se inoculaban con Rup4959ΩKm (A) y Rup4959Km (B) en competición con la cepa silvestre KT2440RTn7-Sm. La recuperación de las bacterias de los ápices radiculares se realizó según se ha descrito en la leyenda de la figura 13S. Los gráficos representan la media y el error estándar de seis plantas.

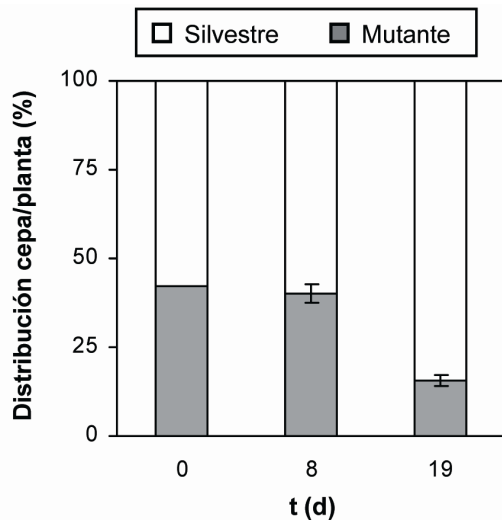


Figura 27S. Fenotipo en la rizosfera del mutante Rup4959ΩTc en competición con la cepa silvestre KT2440RTn 7-Sm. La esterilización e inoculación de las semillas y la recuperación de las bacterias de la rizosfera se realizó según se ha descrito en el capítulo 1. Los histogramas representan la media y el error estándar de seis plantas.

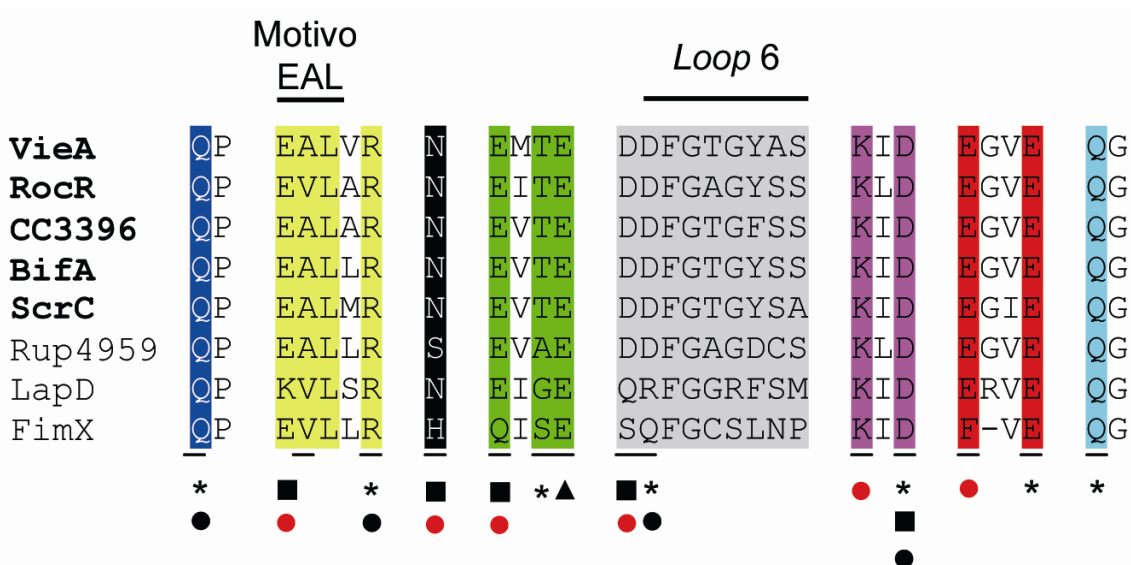


Figura 28S. Residuos conservados en diferentes proteínas con dominios EAL. Las secuencias aminoacídicas de los dominios EAL de distintas proteínas se alinearon usando "ClustalW2" (EBI). Los residuos coloreados resaltan aquellos aminoácidos implicados, directa o indirectamente, en la actividad PDE. En la figura se indican los residuos con un papel principal (●) y secundario (*) en la actividad catalítica. Se muestran también los residuos implicados en la unión del sustrato (●), unión de magnesio (■) y en la estabilización del "loop 6" (▲), cuya secuencia consenso es DFG(T/A)GYSS (Schmidt *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2008). Se ha demostrado actividad PDE en las proteínas VieA (Tamayo *et al.*, 2005), RocR (Rao *et al.*, 2008), CC3396 (Christen *et al.*, 2005), BifA (Kuchma *et al.*, 2007) y ScrC (Ferreira *et al.*, 2008). LapD carece de actividad enzimática (Newell *et al.*, 2009) y FimX presenta muy baja actividad PDE (Rao *et al.*, 2008). Inspirado en Römling (2009).

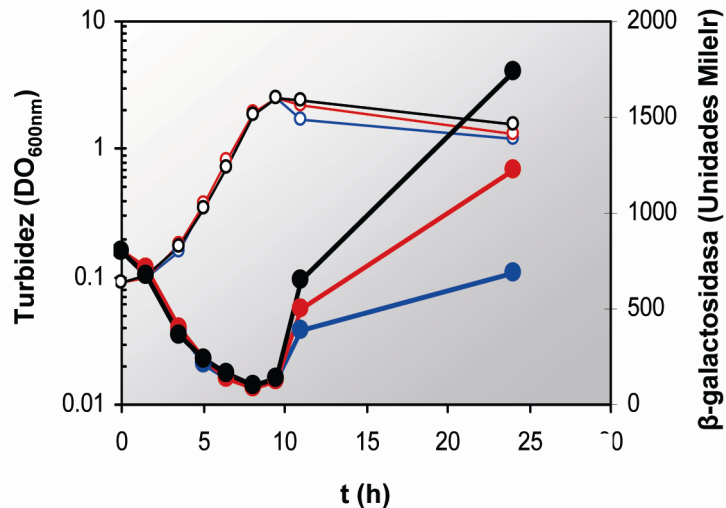


Figura 29S. Efecto de los niveles de di-GMPc sobre la transcripción del gen *rup4959*. KT2440 (pMIR155) (pMAMV12) se cultivó en medio mínimo M9-citrato 15 mM como fuente de carbono (negro), suplido con 0,05% de arabinosa (rojo) ó 0,1% (azul). A los tiempos indicados se midió el crecimiento (símbolos abiertos) y la actividad β-galactosidasa (símbolos cerrados).

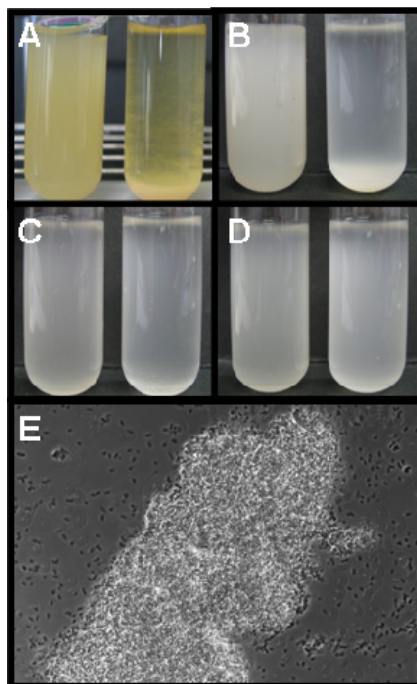


Figura 30S. Floculación de *P. putida* KT2440 (pMAMV1) en diferentes medios de cultivo. Cultivos en LB (A), M9-glucosa 0,5% (peso/volumen) (B), M9-benzoato 10 mM (C) y M9-citrato 15 mM (D) se diluyeron en el mismo medio hasta una DO_{600 nm} = 0,05 y se incubaron durante 16 h en agitación (200 rpm). Para obtener las fotografías, los tubos se mantuvieron en condiciones estáticas durante treinta minutos. En cada panel aparece KT2440 (pBBR1MCS-5) (izquierda) y KT2440 (pMAMV1) (derecha). E, Fotografía de microscopía óptica de un agregado celular de KT2440 (pMAMV1) formado en el cultivo de LB (aumento 400X). Fotografía tomada con una cámara Nikon CCD acoplada a un microscopio Zeiss Axioscope.

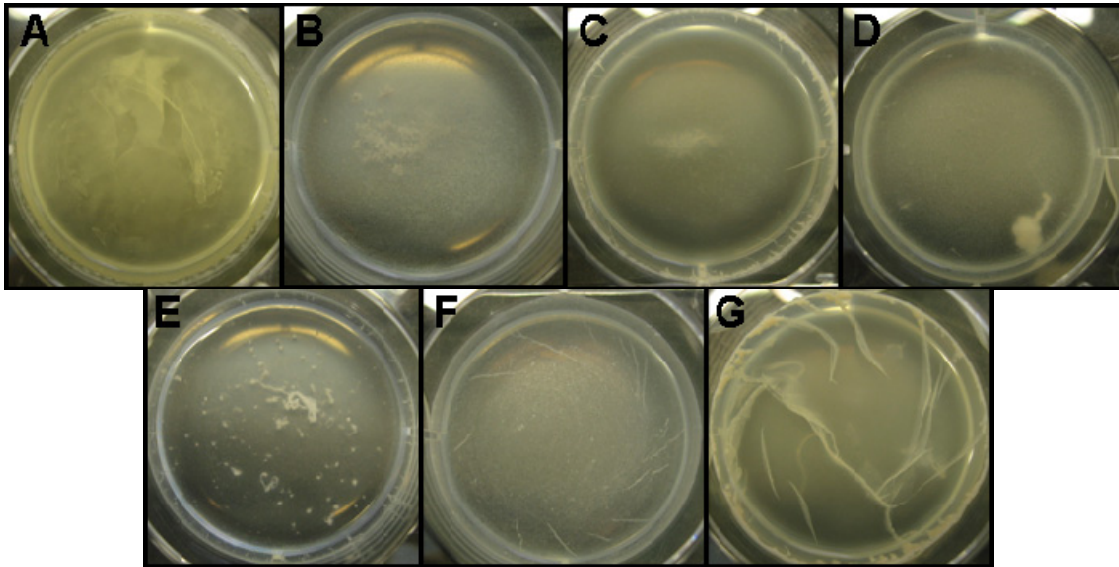


Figura 31S. Formación de biopelículas por *P. putida* KT2440 (pMAMV1) en la interfase líquido-aire en distintos medios de cultivo. Cultivos de 16 h se diluyeron a $DO_{600\text{ nm}} = 0,05$ en el mismo medio. A, LB; B, M9-benzoato 10 mM; C, M9-benzoato 10 mM suplido con CAA 0,5% (peso/volumen); D, M9-citrato 15 mM; E, M9-citrato 15 mM suplido con CAA 0,5% (peso/volumen); F, M9-glucosa 0,5% (peso/volumen); G, M9 con glucosa 0,5% (peso/volumen) suplido con CAA 0,5% (peso/volumen) (G). Cuatro mililitros de dichos cultivos se distribuyeron en placas de seis pocillos de poliestireno y se incubaron durante 24 h en agitación (100 rpm).

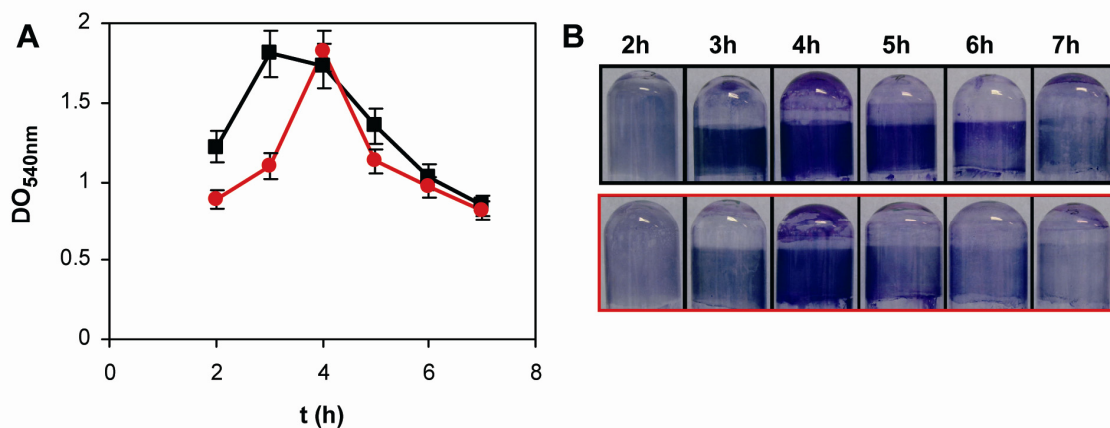


Figura 32S. Un mutante Rup4959ΩKm está ligeramente retrasado en la formación de BPs en superficies abióticas. Cultivos de la cepa silvestre *P. putida* KT2440 (negro) y del mutante (rojo) se ajustaron a $DO_{660\text{ nm}} = 0,05$ en medio M9-glucosa 0,5% (peso/volumen) suplido con CAA 0,5% (peso/volumen). Un mililitro de los cultivos se distribuyó en tubos de borosilicato que se incubaron en un agitador orbital a 40 rpm. A, La gráfica representa la media de tres réplicas biológicas por experimento, con la desviación estándar, de la cuantificación de las BPs usando cristal violeta según el método descrito por O'Toole y Kolter (1998); B, fotografías antes de la cuantificación. El gráfico y las fotografías son representativos de tres experimentos independientes.

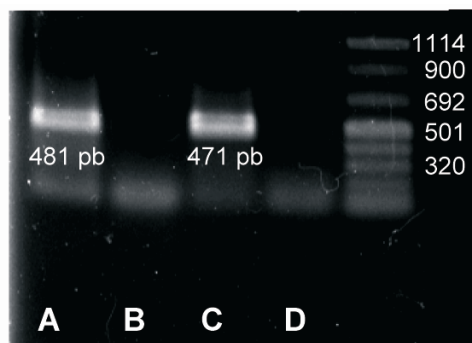


Figura 33S. Los loci PP4958 y PP4957 forman parte de la misma unidad transcripcional que el gen *rup4959*. El ARN de *P. putida* KT2440 en fase estacionaria de crecimiento ($DO_{600\text{ nm}} = 3,3$) se extrajo según se describe en la sección de materiales y métodos del Cap. 4. Para eliminar una posible contaminación con DNA, el ARN se trató con "Turbo DNA free" (Ambion, referencia 1907). Las reacciones de transcripción reversa y amplificación se realizaron empleando "Titan One Tube RT-PCR System" (Roche, número de catálogo 11855476001). A, Fragmento de ADNc amplificado mediante RT-PCR usando los oligonucleótidos correspondientes a los extremos 5' de PP4957 (1; 5'-CCTGCTGTTCTGAAGCTCGCAGAC-3') y 3' de PP4858 (2; 5'-CGCCTCGATCTGACGCATCG-3'); C, Fragmento de ADNc amplificado mediante RT-PCR usando los oligonucleótidos correspondientes a los extremos 5' de PP4958 (3; 5'-CGATGCGTCAGATCGAGGCG-3') y 3' de *rup4959* (4; 5'-GTTGGTTCGCAGCGTGATCGG-3'); B y D, controles de las RT-PCRs obtenidos tras inactivar por calor la retrotranscriptasa en las muestras duplicadas de A y C, respectivamente.

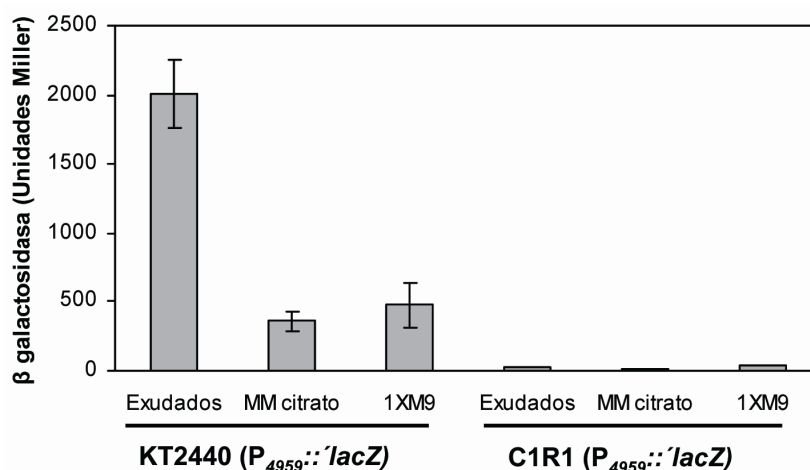


Figura 34S. La inducción transcripcional del gen *rup4959* en presencia de exudados radiculares de *Zea mays* requiere del factor σ^{38} . El ensayo se realizó exactamente como se describe en la leyenda de la fig. 3 (Cap. 4), excepto que se incluye un control adicionando 1x M9, además del control de M9-citrato 15 mM. La actividad β -galactosidasa se midió dos horas después de añadir los exudados, o los controles, a cultivos de KT2440 ($pMAMV12$) y C1R1 ($pMAMV12$) a $DO_{600\text{ nm}} = 2$. El gráfico representa una media de tres experimentos con dos réplicas biológicas por experimento y se incluye la desviación estándar.

Tabla 2S. Dipéptidos y tripéptidos utilizados como fuente de carbono y nitrógeno.

Ala-Glu	Ala-Gly	Ala-Phe	Ala-Pro
Ala-His	Ala-Leu	Ala-Thr	Gly-Gln
Gly-Glu	Gly-Gly	Gly-Pro	Gly-Ser
Gly-Leu	Gly-Phe	Gly-Tyr	Gly-Val
Leu-Leu	Leu-Pro	Gly-Gly-Ala	Gly-Gly-Gly
Tyr-Ala	Ala-Ala-Ala	Gly-Gly-Leu	Ile-Pro-Ile
Leu-Gly-Gly	Lys-Lys-Lys	Val-Tyr-Val	

VI. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis Doctoral han permitido establecer las siguientes conclusiones:

1. Ha sido posible realizar un análisis genómico de *Pseudomonas putida* en la rizosfera de plantas de maíz empleando un sistema experimental idéntico al utilizado en los estudios de colonización. La extracción de ARN en cantidad y calidad óptimas ha hecho innecesaria una alteración de las condiciones naturales del sistema, tales como la adición de nutrientes o el cultivo planctónico.

2. Las variaciones transcripcionales observadas en el análisis genómico reflejan, por una parte, una adaptación nutricional y, por otra, una adaptación fisiológica a las condiciones de estrés existentes en la rizosfera.

3. *Pseudomonas putida* KT2440 coloniza eficientemente la rizosfera de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Esta colonización se requiere para proteger mediante resistencia sistémica la parte aérea de la planta de la infección por la bacteria fitopatógena *P. syringae* pv. *tomato* DC3000.

4. El análisis transcripcional en la rizosfera ha permitido la identificación de nuevos determinantes bacterianos importantes para la colonización y el desencadenamiento de resistencia sistémica inducida. Así, la peroxidasa extracelular codificada por el locus PP2561 es importante tanto para la eficiencia de esta bacteria en la rizosfera como para el desarrollo de sus propiedades como agente potencial de biocontrol.

5. *P. putida* KT2440 incrementa los niveles de exudación de plantas de *A. thaliana* cultivadas "in vitro" en condiciones gnotobióticas e imprime una huella específica en el patrón de exudación de metabolitos secundarios. Este patrón se altera en plantas colonizadas por el mutante PP2561, lo que permite establecer una relación entre la composición de los exudados radiculares y la inducción de la resistencia sistémica.

6. La motilidad tipo "swarming" exhibida por KT2440 requiere de un estado nutricional bien definido, en el que juega un papel importante la concentración intracelular de hierro y/o su transporte activo al interior celular.

7. El movimiento tipo "swarming" en *P. putida* depende de la temperatura y de la presencia de pili de tipo IV y lipopolisacáridos. Dicha motilidad en superficie, junto con el movimiento tipo "swimming" y la adhesión a superficies vegetales son parámetros que afectan a la eficiencia colonizadora de KT2440.

8. En presencia de exudados radiculares y bajo condiciones que imperan en la rizosfera tales como la baja tensión de oxígeno se activa la transcripción de *rup4959* y ligeramente la del factor sigma alternativo RpoS. La expresión de *rup4959* depende de RpoS, lo que sugiere que su activación transcripcional sea, en parte, consecuencia del incremento en los niveles de este factor sigma.

9. La inactivación de *Rup4959*, un regulador de respuesta dual GGDEF/EAL, y un análisis transcriptómico en la rizosfera de un mutante en esta proteína revelaron que la mayor fracción de genes con transcripción alterada fueron de función desconocida, como una indicación de que los fenotipos o los mecanismos relacionados con dicho regulador están inexplorados.

10. La sobreexpresión de *rup4959* ha permitido adjudicar actividad diguanilato ciclasa al regulador de respuesta que codifica dicho gen y caracterizar el fenotipo pleiotrópico que se establece cuando se incrementan los niveles del segundo mensajero di-GMPc. Para la adquisición de este fenotipo se requiere la presencia de lipopolisacáridos y ciertos exopolisacáridos aún sin caracterizar.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Achouak, W., Conrod, S., Cohen, V. and Heulin, T. (2004) Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, pp. 872–879.
- Allan, V.J.M., Callow, M.E., Macaskie, L.E. and Paterson-Beedle, M. (2002) Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp. *Microbiology*, 148 (1), pp. 277–288.
- Allaway, D., Schofield, N.A., Leonard, M.E., Gilardoni, L., Finan, T.M. and Poole, P.S. (2001) Use of differential fluorescence induction and optical trapping to isolate environmentally induced genes. *Environmental Microbiology*, 3 (6), pp. 397–406.
- Alm, R.A., Boder, A.J., Free, P.D. and Mattick, J.S. (1996) Identification of a novel gene, *pilZ*, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 178 (1), pp. 46–53.
- Amikam, D. and Galperin, M.Y. (2006) PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*, 22 (1), pp. 3–6.
- Anderson, A.J., Habibzadegah-Tari, P. and Tepper, C.S. (1988) Molecular studies on the role of a root surface agglutinin in adherence and colonization by *Pseudomonas putida*. *Applied Environmental Microbiology*, 54 (2), pp. 375–380.
- Andrade, M.O., Alegria, M.C., Guzzo, C.R., Docena, C., Pareda-Rosa, M.C., Ramos, C.H.I. and Farah, C.S. (2006) The HD-GYP domain of RpfG mediates a direct linkage between the Rpf quorum-sensing pathway and a subset of diguanylate cyclase proteins in the phytopathogen *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. *Molecular Microbiology*, 62 (2), pp. 537–551.
- Andreote, F.D., Carneiro, R.T., Salles, J.F., Marcon, J., Labate, C.M., Azevedo, J.L. and Araújo, W.L. (2009) Culture-independent assessment of rhizobiales-related alphaproteobacteria and the diversity of *Methylobacterium* in the rhizosphere and rhizoplane of transgenic *Eucalyptus*. *Microbial Ecology*, 57, pp. 82–93.
- Arafat, H.H., Tanaka, K., Sawada, H. and Suzuki, K. (2009) Variation of lipopolysaccharide among the three major *Agrobacterium* species and the effect of environmental stress on the lipopolysaccharide profile. *Plant Pathology Journal*, 8 (1), pp. 1–8.
- Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S. and Ramphal, R. (1997) A transcriptional activator, FleQ, regulates mucin adhesion and flagellar gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* a cascade manner. *Journal of Bacteriology*, 179, pp. 5574–5581.
- Arsène, F., Katupitiya, S., Kennedy, I.R. and Elmerich, C. (1994) Use of lacZ fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 7 (6), pp. 748–757.
- Assmus, B., Hutzler, P., Kirchhof, G., Amann, R., Lawrence, J.R. and Hartmann, A. (1995) In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3), pp. 1013–1019.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., and Höfte, M. (2002) Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of

salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, pp. 1147-1156.

Badalucco, L. and Nannipieri, P. (2007) Nutrient transformation in the rhizosphere. In Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. (eds.) *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, New York, pp. 111-133.

Badri, D.V., Loyola-Vargas, V.M., Broeckling, C.D., De-la-Pena, C., Jasinski, M., Santelia, D., et al. (2008) Altered profile of secondary metabolites in the root exudates of *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter mutants. *Plant Physiology*, 146 (2), pp. 762-771.

Badri, D.V. and Vivanco, J.M. (2009) Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment*, 32 (6), pp. 666-681.

Bahat-Samet, E., Castro-Sowinski, S. and Okon, Y. (2004) Arabinose content of extracellular polysaccharide plays a role in cell aggregation of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiology Letters*, 237 (2), pp. 195-203.

Bais, H.P., Prithiviraj, B., Jha, A.K., Ausubel, F.M. and Vivanco, J.M. (2005) Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature*, 434 (7030), pp. 217-221.

Bais, H.P., Weir, T.L., Perry, L.G., Gilroy S. and Vivanco J.M. (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, pp. 233-266.

Barak, J.D., Jahn, C.E., Gibson, D.L. and Charkowski, A.O. (2007) The role of cellulose and O-antigen capsule in the colonization of plants by *Salmonella enterica*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (9), pp. 1083-1091.

Barbosa, R.L. and Benedetti, C.E. (2007) BigR, a transcriptional repressor from plant-associated bacteria, regulates an operon implicated in biofilm growth. *Journal of Bacteriology*, 189 (17), pp. 6185-6194.

Bardy, S.L., Ng, S.Y.M. and Jarrell, K.F. (2003) Prokaryotic motility structures. *Microbiology*, 149 (2), pp. 295-304.

Barr, M., East, A.K., Leonard, M., Mauchline, T.H. and Poole, P.S. (2008) In vivo expression technology (IVET) selection of genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae A34 expressed in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters* 282 (2), pp. 219-227.

Beloin, C. and Ghigo, J.M. (2005) Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms. *Trends in Microbiology*, 13 (1), pp. 16-19.

Benach, J., Swaminathan, S.S., Tamayo, R., Handelman, S.K., Folta-Stogniew, E., Ramos, J.E., et al. (2007) The structural basis of cyclic diguanylate signal transduction by PilZ domains. *EMBO Journal*, 26 (24), pp. 5153-5166.

Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A. and Smalla, K. (2002) Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (7), pp. 3328-3338.

- Berg, G. and Smalla, K.** (2009) Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 68 (1), pp. 1-13.
- Bertin, C., Yang, X. and Weston, L.A.** (2003) The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 256 (1), pp. 67-83.
- Beyhan, S. and Yildiz, F.H.** (2007) Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signalling pathway. *Molecular Microbiology*, 63 (4), pp. 995-1007.
- Bianciotto, V., Andreotti, S., Balestrini, R., Bonfante, P. and Perotto, S.** (2001) Mucoid mutants of the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 show increased ability in biofilm formation on mycorrhizal and nonmycorrhizal carrot roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14 (2), pp. 255-260.
- Bloemberg, G.V.** (2007) Microscopic analysis of plant-bacterium interactions using auto fluorescent proteins. *European Journal of Plant Pathology*, 119 (3), pp. 301-309.
- Bobrov, A.G., Kirillina, O., Forman, S., Mack, D. and Perry, R.D.** (2008) Insights into *Yersinia pestis* biofilm development: Topology and co-interaction of Hms inner membrane proteins involved in exopolysaccharide production. *Environmental Microbiology*, 10 (6), pp. 1419-1432.
- Böhm, M., Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B.** (2007) Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (5), pp. 526-533
- Boldt, T.S., Sorensen, J., Karlson, U., Molin, S. and Ramos, C.** (2004) Combined use of different Gfp reporters for monitoring single-cell activities of a genetically modified PCB degrader in the rhizosphere of alfalfa. *FEMS Microbiology Ecology*, 48 (2), pp. 139-148.
- Boles, B.R., Thoendel, M. and Singh, P.K.** (2004) Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (47), pp. 16630-16635.
- Bowers, J.H. and Parke, J.L.** (1993) Colonisation of pea (*Pisum sativum* L.) taproots by *Pseudomonas fluorescens*: effect of soil temperature and bacterial motility. *Soil Biology and Biochemistry*, 25, pp. 1693-1701.
- Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L. and Kolter, R.** (2005) Biofilms: The matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13 (1), pp. 20-26.
- Brimecombe, M.J., De Leij, F.A.A.M. and Lynch, J.M.** (2007) Rhizodeposition and microbial populations. In Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. (eds.) *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, New York, pp. 73-109.
- Brown, M.H., Paulsen, I.T. and Skurray, R.A.** (1999) The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters [2]. *Molecular Microbiology*, 31 (1), pp. 394-395.
- Bull, C. T., Weller, D. M. and Thomashow, L. S.** (1991) Relationship between root colonization and suppression of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79. *Phytopathology*, 81, pp. 954-959.

Bunai, K. and Yamane, K. (2005) Effectiveness and limitation of two-dimensional gel electrophoresis in bacterial membrane protein proteomics and perspectives. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 815 (1-2), pp. 227-236.

Buyer, J.S., Roberts, D.P. and Russek-Cohen, E. (2002) Soil and plant effects on microbial community structure. *Canadian Journal of Microbiology*, 48 (11), pp. 955-964.

Camacho-Carvajal, M.M., Wijfjes, A.H.M., Mulders, I.H.M., Lugtenberg, B.J.J. and Bloemberg, G.V. (2002) Characterization of NADH dehydrogenases of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 and their role in competitive root colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15 (7), pp. 662-671.

Capdevila, S., Martínez-Granero, F.M., Sánchez-Contreras, M., Rivilla, R. and Martín, M. (2004) Analysis of *Pseudomonas fluorescens* F113 genes implicated in flagellar filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology*, 150 (11), pp. 3889-3897.

Cavaglieri, L., Orlando, J. and Etcheverry, M. (2007) Rhizosphere microbial community structure at different maize plant growth stages and root locations. *Microbial Research*, 164 (4), pp. 391-399.

Cha, C., Gao, P., Chen, Y.-C., Shaw, P.D. and Farrand, S.K. (1998) Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11 (11), pp. 1119-1129.

Chan, C., Paul, R., Samoray, D., Amiot, N.C., Giese, B., Jenal, U. and Schirmer, T. (2004) Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (49), pp. 17084-17089.

Chancey, S.T., Wood, D.W., Pierson, E.A. and Pierson, III L.S. (2002) Survival of GacS/GacA mutants of the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (7), pp. 3308-3314.

Chang, A.L., Tuckerman, J.R., González, G., Mayer, R., Weinhouse, H., Volman, G., et al. (2001) Phosphodiesterase A1, a regulator of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry*, 40 (12), pp. 3420-3426.

Cheng, W., Coleman, D.C., Carroll, C.R., and Hoffman, C.A. (1993) *In situ* measurement of root respiration and soluble C concentrations in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(9), pp. 1189-1196.

Chin-A-Woeng, T.F.C., De Priester, W., Van Der Bij, A.J. and Lugtenberg, B.J.J. (1997) Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10 (1), pp. 79-86.

Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Mulders, I.H.M., Dekkers, L.C. and Lugtenberg B.J.J. (2000) Root colonization by Phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, pp. 1340-1345.

- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. and Jenal, U. (2005) Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (35), pp. 30829-30837.
- Christen, B., Christen, M., Paul, R., Schmid, F., Folcher, M., Jenoe, P., *et al.* (2006) Allosteric control of cyclic di-GMP signalling. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (42), pp. 32015-32024.
- Christen, M., Christen, B., Allan, M.G., Folcher, M., Jenoe, P., Grzesiek, S. and Jenal, U. (2007) DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (10), pp. 4112-4117.
- Conn, V.M., Walker, A.R. and Franco, C.M.M. (2008) Endophytic actinobacteria induce defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (2), pp. 208-218.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., *et al.* (2006) Priming: Getting ready for battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (10), pp. 1062-1071.
- Cotter, P.A. and Stibitz, S. (2007) c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*, 10 (1), pp. 17-23.
- Croes, C.L., Moens, S., Van Bastelaere, E., Vanderleyden, J. and Michiels K.W. (1993) The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *Journal of General Microbiology*, 139 (9), pp. 2261-2269.
- Czarnota, M.A., Rimando A.M. and Weston, L.A. (2003) Evaluation of root exudates of seven sorghum accessions. *Journal of Chemical Ecology*, 29 (9), pp. 2073-2083.
- Dakora, F.D. and Phillips, D.A. (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, 245 (1), pp. 35-47.
- Dandurand, L.M., Schotzko, D.J. and Knudsen, G.R. (1997) Spatial patterns of rhizoplane populations of *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (8), pp. 3211-3217.
- Danhorn, T. and Fuqua, C. (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61, pp. 401-422.
- Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 28 (3), pp. 261-289.
- Darrah, P.R. and Roose, T. (2007) Modeling the Rhizosphere. In Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. (eds.) *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, New York, pp. 331-370.
- Dasgupta, N., Wolfgang, M.C., Goodman, A.L., Arora, S.K., Jyot, J., Lory, S. and Ramphal, R. (2003) A four-tiered transcriptional regulatory circuit controls flagellar biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 50 (3), pp. 809-824.

De la Pena, C., Lei, Z., Watson, B.S., Sumner, L.W. and Vivanco, J.M. (2008) Root-microbe communication through protein secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (37), pp. 25247-25255.

De Meyer, G., Audenaert, K. and Hofte, M. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on in planta salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *European Journal of Plant Pathology*, 105 (5), pp. 513-517.

De Ridder-Duine, A.S., Kowalchuk, G.A., Klein-Gunnewiek, P.J.A., Smant, W., Van Veen, J.A. and De Boer W. (2005) Rhizosphere bacterial community composition in natural stands of *Carex arenaria* (sand sedge) is determined by bulk soil community composition. *Soil Biology and Biochemistry*, 37 (2), pp. 349-357.

de Weger, L.A., *et al.* (1987) Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *Journal of Bacteriology*, 169, pp. 2769-2773.

de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I.H.M., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G.V., *et al.* (2002) Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15, pp. 1173-1180.

de Weert, S., Dekkers, L.C., Bitter, W., Tuinman, S., Wijffjes, A.H.M., Van Boxtel, R. and Lugtenberg, B.J.J. (2006) The two-component colR/S system of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 plays a role in rhizosphere competence through maintaining the structure and function of the outer membrane. *FEMS Microbiology Ecology*, 58 (2), pp. 205-213.

DeFlaun, M.F., Marshall, B.M., Kulle, E.P. and Levy S.B. (1994) Tn5 insertion mutants of *Pseudomonas fluorescens* defective in adhesion to soil and seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (7), pp. 2637-2642.

Deka-Boruah, H.P. and Dileep-Kumar, B.S. (2002) Plant disease suppression and growth promotion by a fluorescent *Pseudomonas* strain. *Folia Microbiologica*, 47 (2), pp. 137-143

Dekkers, L.C., Bloemendaal, C.J.P., De Weger, L.A., Wijffelman, C.A., Spaink, H.P. and Lugtenberg, B.J.J. (1998a) A two-component system plays an important role in the root-colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11 (1), pp. 45-56.

Dekkers, L. C., Phoelich, C. C., Van Der Fits, L. and Lugtenberg, B. J. J. (1998b). A site-specific recombinase is required for competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, pp. 7051-7056.

Dekkers, L.C., Van Der Bij, A.J., Mulders, I.H.M., Phoelich, C.C., Wentwoord, R.A.R., Glandorf, D.C.M., *et al.* (1998c) Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11 (8), pp. 763-771.

Dermić, D. (2006) Functions of multiple exonucleases are essential for cell viability, DNA repair and homologous recombination in recD mutants of *Escherichia coli*. *Genetics*, 172 (4), pp. 2057-2069.

Desnoues, N., Lin, M., Guo, X., Ma, L., Carreno-Lopez, R. and Elmerich, C. (2003) Nitrogen fixation genetics and regulation in a *Pseudomonas stutzeri* strain associated with rice. *Microbiology*, 149 (8), pp. 2251-2262.

Déziel, 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-hydroxyalkanooyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, 149 (8), pp. 2005-2013.

Dinamarca, M.A., Aranda-Olmedo, I., Puyet, A. and Rojo, F. (2003) Expression of the *Pseudomonas putida* OCT plasmid alkane degradation pathway is modulated by two different global control signals: evidence from continuous cultures. *Journal of Bacteriology* 185, 4772-4778.

Dixon, R. and Kahn, D. (2004) Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (8), pp. 621-631.

Djavaheri, M. (2007) Iron regulated metabolites of plant growth promoting *Pseudomonas fluorescens* WCS374: Their role in induced systemic resistance. PhD thesis, Utrecht University, The Netherlands.

Domínguez-Cuevas, P., Gonzalez-Pastor, J.-E., Marques, S., Ramos, J.L. and De Lorenzo, V. (2006) Transcriptional tradeoff between metabolic and stress-response programs in *Pseudomonas putida* KT2440 cells exposed to toluene. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (17), pp. 11981-11991.

Dörr, J., Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B. (1998) Type IV pili are involved in plant-microbe and fungus-microbe interactions. *Molecular Microbiology*, 30 (1), pp. 7-17.

Dow, J.M., Crossman, L., Findlay, K., He, Y.Q., Feng, J.X. and Tang, J.L. (2003) Biofilm dispersal in *Xanthomonas campestris* is controlled by cell-cell signaling and is required for full virulence to plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (19), pp. 10995-11000.

Dow, J.M., Fouhy, Y., Lucey, J.F. and Ryan, R.P. (2006) The HD-GYP domain, cyclic Di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19 (12), pp. 1378-1384.

Driouich, A., Durand, C. and Vire-Gibouin, M. (2007) Formation and separation of root border cells. *Trends in Plant Science*, 12 (1), pp. 14-19.

Duffy, B.K. and Défago, G. (2000) Controlling instability in *gacS-gacA* regulatory genes during inoculant production of *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (8), pp. 3142-3150.

Dunand, C., Crevecoeur, M. and Penel C. (2007) Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: Possible interaction with peroxidases. *New Phytologist*, 174 (2), pp. 332-341.

Dunn, A.K., Klimowicz, A.K. and Handelsman, J. (2003) Use of a promoter trap to identify *Bacillus cereus* genes regulated by tomato seed exudate and a rhizosphere resident, *Pseudomonas aureofaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (2), pp. 1197-1205.

Duque, E., Molina-Henares, A.J., de la Torre, J., Molina-Henares, M.A., del Castillo, T., Lam, J. and Ramos, J.L. (2007) Towards a genome-wide mutant library of *Pseudomonas putida* strain kt2440. In *Pseudomonas: A Model System in Biology*.

Ramos, J.L. and Filloux, A. (eds). Dorchester, The Netherlands: Springer, Vol. V, pp. 227–251.

Ebel, J. and Mithöfer, A. (1998) Early events in the elicitation of plant defence. *Planta*, 206, pp. 335-348.

Egener, T., Hurek, T. and Reinhold-Hurek, B. (1998) Use of green fluorescent protein to detect expression of *nif* genes of *Azoarcus* sp. BH72, a grass-associated diazotroph, on rice roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11 (1), pp. 71-75.

Elasri, M., Delorme, S., Lemanceau, P., Stewart, G., Laue, B., Glickmann, E., *et al.* (2001) Acyl-Homoserine Lactone Production Is More Common among Plant-Associated *Pseudomonas* spp. than among Soilborne *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (3), pp. 1198-1209.

Else, T.A., Pantle, C.R. and Amy, P.S. (2003) Boundaries for biofilm formation: Humidity and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (8), pp. 5006-501.

Espinosa-Urgel, M., Salido, A. and Ramos J.L. (2000) Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* to seeds. *Journal of Bacteriology*, 182 (9), pp. 2363-2369.

Espinosa-Urgel, M. and Ramos, J.L. (2001) Expression of a *Pseudomonas putida* aminotransferase involved in lysine catabolism is induced in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (11), pp. 5219-5224.

Espinosa-Urgel, M., Kolter, R. and Ramos, J.L. (2002) Root colonization by *Pseudomonas putida*: Love at first sight. *Microbiology*, 148 (2), pp. 341-343.

Espinosa-Urgel, M. (2004) Plant-associated *Pseudomonas* populations: Molecular biology, DNA dynamics, and gene transfer. *Plasmid*, 52 (3), pp. 139-150.

Espinosa-Urgel M. and Ramos J.L. (2004) Cell density-dependent gene contributes to efficient seed colonization by *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (9), pp. 5190-5198.

Espinosa-Urgel, M. and Ramos-González, M.I. (2004) In Vivo Gene Expression: The Ivet System. In Ramos, J.L. (ed.) *Pseudomonas: Genomics, Life Style and Molecular Architecture*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Vol. I, pp. 351-366.

Fernández-Piñar, R., Ramos, J.L., Rodríguez-Herva, J.J. and Espinosa-Urgel, M. (2008) A two-component regulatory system integrates redox state and population density sensing in *Pseudomonas putida*. *Journal of Bacteriology*, 190 (23), pp. 7666-7674.

Ferreira, R.B.R., Antunes, L.C.M., 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 (3) pp. 851–860.

Fierer, N. and Jackson, R.B. (2006) The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (3), pp. 626-631.

Filion, M., Hamelin, R.C., Bernier, L. and St.-Arnaud M. (2004) Molecular profiling of rhizosphere microbial communities associated with healthy and diseased black

spruce (*Picea mariana*) seedlings grown in a nursery. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (6), pp. 3541-3551.

Fineran, P.C., Williamson, N.R., Lilley, K.S. and Salmond, G.P.C. (2007) Virulence and prodigiosin antibiotic biosynthesis in *Serratia* are regulated pleiotropically by the GGDEF/EAL domain protein, PigX. *Journal of Bacteriology*, 189 (21), pp. 7653-7662.

Finn, R.D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P.C., Sammut, S.J., Hotz, H.R., et al. (2008) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Research*, 36: D281-D288.

Fischer, S.E., Miguel, M.J. and Mori, G.B. (2003) Effect of root exudates on the exopolysaccharide composition and the lipopolysaccharide profile of *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress. *FEMS Microbiology Letters*, 219 (1), pp. 53-62.

Foster, R.C. (1988) Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 6 (3), pp. 189-203.

Franks, A., Mark-Byrne, G.L., Dow, J.M. and O'Gara, F. (2008) A putative RNA-binding protein has a role in virulence in *Ralstonia solanacearum* GMI1000. *Molecular Plant Pathology*, 9 (1), pp. 67-72.

Friedman, L. and Kolter, R. (2004a) Genes involved in matrix formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14 biofilms. *Molecular Microbiology*, 51 (3), pp. 675-690.

Friedman, L. and Kolter, R. (2004b) Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Journal of Bacteriology*, 186 (14), pp. 4457-4465.

Futamata, H., Sakai, M., Ozawa, H., Urashima, Y., Sueguchi, T. and Matsuguchi, T. (1998) Chemotactic response to amino acids of fluorescent pseudomonads isolated from spinach roots grown in soils with different salinity levels. *Soil Science and Plant Nutrition*, 44 (1), pp. 1-7.

Gal, M., Preston, G.M., Massey, R.C., Spiers, A.J. and Rainey, P.B. (2003) Genes encoding a cellulosic polymer contribute toward the ecological success of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 on plant surfaces. *Molecular Ecology*, 12 (11), pp. 3109-3121.

Galperin, M.Y., Nikolskaya, A.N. and Koonin, E.V. (2001) Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. *FEMS Microbiology Letters*, 203 (1), pp. 11-21.

Galperin, M.Y. (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environmental Microbiology*, 6 (6), pp. 552-567.

Gamalero, E., Lingua, G., Tombolini, R., Avidano, L., Pivato, B. and Berta, G. (2005) Colonization of tomato root seedling by *Pseudomonas fluorescens* 92rkG5: Spatio-temporal dynamics, localization, organization, viability, and culturability. *Microbial Ecology*, 50 (2), pp. 289-297

Gantner, S., Schmid, M., Durr, C., Schuegger, R., Steidle, A., Hutzler, P., et al. (2006) *In situ* quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 56 (2), pp. 188-194.

- Gao, M., D'Haese, W., De Rycke, R., Wolucka, B. and Holsters, M.** (2001) Knockout of an azorhizobial dTDP-L-rhamnose synthase affects lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide production and disables symbiosis with *Sesbania rostrata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14 (7), pp. 857-866.
- Gao M., Teplitski, M., Robinson, J.B. and Bauer, W.D.** (2003) Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16 (9), pp. 827-834.
- Gao M., Chen H., Eberhard A., Gronquist M.R., Robinson J.B., Connolly M., et al.** (2007) Effects of AiiA-mediated quorum quenching in *Sinorhizobium meliloti* on quorum-sensing signals, proteome patterns, and symbiotic interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (7), pp. 843-856.
- Garbeva, P., van Elsas, J.D. and van Veen, J.A.** (2008) Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. *Plant Soil*, 302, pp. 19-32.
- García, B., Latasa, C., Solano, C., Garcia-Del Portillo, F., Gamazo, C. and Lasa, I.** (2004) Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 54 (1), pp. 264-277.
- Ghigo J.M.** (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, 412 (6845), pp. 442-445.
- Gjermansen, M., Ragas, P. and Tolker-Nielsen, T.** (2006) Proteins with GGDEF and EAL domains regulate *Pseudomonas putida* biofilm formation and dispersal. *FEMS Microbiology Letters*, 265 (2), pp. 215-224.
- Gorski, L., Duhé, J.M. and Flaherty, D.** (2009) The use of flagella and motility for plant colonization and fitness by different strains of the foodborne pathogen *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE* 4 (4), art. no. e5142.
- Gransee, A. and Wittenmayer, L.** (2000) Qualitative and quantitative analysis of water-soluble root exudates in relation to plant species and development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 163 (4), pp. 381-385.
- Grayston, S.J. and Campbell, C.D.** (1996) Functional biodiversity of microbial communities in the rhizospheres of hybrid larch (*Larix eurolepis*) and Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *Tree Physiology*, 16 (11-12), pp. 1031-1038.
- Güvener Z.T. and Harwood C.S.** (2007) Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. *Molecular Microbiology*, 66 (6), pp. 1459-1473.
- Gygi, D., Rahman, M.M., Lai, H.C., Carlson, R., Guard-Petter, J. and Hughes, C.** (1995) A cell-surface polysaccharide that facilitates rapid population migration by differentiated swarm cells of *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology*, 17 (6), pp. 1167-1175.
- Haas, D. and Défago, G.** (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Review Microbiology*, 3, pp. 307-319.

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. and Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2 (2), pp. 95-108.
- Hammer, B.K. and Bassler, B.L. (2009) Distinct sensory pathways in *Vibrio cholerae* El Tor and classical biotypes modulate cyclic dimeric GMP levels to control biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 91 (1), pp. 169-177.
- Han, S.H., Anderson, A.J., Yang, K.Y., Cho, B.H., Kim, K.Y., Lee, M.C., Kim, Y.H., *et al.* (2006) Multiple determinants influence root colonization and induction of induced systemic resistance by *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Molecular Plant Pathology*, 7 (6), pp. 463-472.
- Harshey, R.M. (2003) Bacterial Motility on a Surface: Many Ways to a Common Goal. *Annual Review of Microbiology*, 57, pp. 249-273.
- Hausner, M. and Wuertz, S. (1999) High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (8), pp. 3710-3713.
- Hawes, M.C. and Pueppke, S.G. (1989) Reduced rhizosphere colonization ability of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence (chv) mutants. *Plant and Soil*, 113 (1), pp. 129-132.
- Hawes, M.C., Bengough, G., Cassab, G. and Ponce, G. (2002) Root caps and rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21 (4), pp. 352-367.
- Hawkes, C.V., K. DeAngelis, K.M. and Firestone, M.K. (2007) Root interactions with soil microbial communities and processes. In Cardon, Z. and Whitbeck, J. (eds.), *The Rhizosphere an Ecological Perspective*. Elsevier Academic Press, New York, pp.1-31.
- Hay, I.D., Remminghorst, U. and Rehm, B.H.A. (2009) MucR, a novel membrane-associated regulator of alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (4), pp. 1110-1120.
- He Y.W. and Zhang, L.H. (2008) Quorum sensing and virulence regulation in *Xanthomonas campestris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 32 (5), pp. 842-857.
- Hecht, G.B. and Newton, A. (1995) Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to- stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 177 (21), pp. 6223-6229.
- Heeb, S. and Haas, D. (2001) Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other Gram-negative bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14 (12), pp. 1351-1363.
- Hengge, R. (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 7 (4), pp. 263-273.
- Heulin, T., Guckert, A. and Balandreau, J. (1987) Stimulation of root exudation of rice seedlings by *Azospirillum* strains: carbon budget under gnotobiotic conditions. *Biology and Fertility of Soils*, 4 (1-2), pp. 9-14.
- Hickman, J.W., Tifrea, D.F. and Harwood, C.S. (2005) A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102 (40), pp. 14422-14427.

Hickman, J.W. and Harwood, C.S. (2008) Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Molecular Microbiology*, 69 (2), pp. 376-389.

Hiltner, L. (1904) U"ber neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Ber"ucksichtigung der Gr"undung und Brache. *Arb Dtsch Landwirtsch Ges Berl*, 98, pp. 59-78.

Hinsa, S.M., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J.L. and O'Toole, G.A. (2003) Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Molecular Microbiology*, 49 (4), pp. 905-918.

Hinsa, S.M. and O'Toole, G.A. (2006) Biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365: A role for LapD. *Microbiology*, 152 (5), pp. 1375-1383.

Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C. and Jaillard, B. (2003) Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, 248 (1-2), pp. 43-59.

Hitchcock, P.J. and Brown, T.M. (1983) Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *Journal of Bacteriology*, 154 (1), pp. 269-277.

H"ofte, M., Boelens, J. and Verstraete, W. (1992) Survival and root colonization of mutants of plant growth-promoting pseudomonads affected in siderophore biosynthesis or regulation of siderophore production. *Journal of Plant Nutrition*, 15, 2253-2262.

H"ojberg, O. and Sorensen, J. (1993) Microgradients of microbial oxygen consumption in a barley rhizosphere model system. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (2), pp. 431-437.

H"ojberg, O., Schnider, U., Winteler, H.V., Sorensen, J. and Haas D. (1999) Oxygen-sensing reporter strain of *Pseudomonas fluorescens* for monitoring the distribution of low-oxygen habitats in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (9), pp. 4085-4093.

Holguin, G. and Bashan, Y. (1996) Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* CD is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.) *Soil Biology and Biochemistry*, 28 (12), pp. 1651-1660.

Houlden, A., Timms-Wilson, T.M., Day, M.J. and Bailey, M.J. (2008) Influence of plant developmental stage on microbial community structure and activity in the rhizosphere of three field crops. *FEMS Microbiology Ecology*, 65 (2), pp. 193-201.

Howden, A.J.M., Harrison, J.C. and Preston, G.M. (2009) A conserved mechanism for nitrile metabolism in bacteria and plants. *Plant Journal*, 57 (2), pp. 243-253.

Howie, W.J., Cook, R.J. and Weller, D.M. (1987) Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonisation by fluorescent pseudomonads suppressive to take all. *Phytopathology*, 77, 286-292.

- Hozore, E. and Alexander, M. (1991) Bacterial characteristics important to rhizosphere competence. *Soil Biology and Biochemistry*, 23 (8), pp. 717-723.
- Huang, B., Whitchurch, C.B. and Mattick, J.S. (2003) FimX, a Multidomain Protein Connecting Environmental Signals to Twitching Motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 185 (24), pp. 7068-7076.
- Iavicoli, A., Boutet, E., Buchala, A. and Métraux, J. P. (2003) Induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* in response to root inoculation with *Pseudomonas fluorescens* CHA0. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, pp. 851-858.
- 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 (3), pp. 950-957.
- Ishikawa, C.M. and Bledsoe, C.S. (2000) Seasonal and diurnal patterns of soil water potential in the rhizosphere of blue oaks: Evidence for hydraulic lift. *Oecologia*, 125 (4), pp. 459-465.
- Jackson, R.W., Preston, G.M. and Rainey, P.B. (2005) Genetic characterization of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 *rsp* gene expression in the phytosphere and in vitro. *Journal of Bacteriology*, 187 (24), pp. 8477-8488.
- Jacques, P., Ongena, M., Bernard, F., Fuchs, R., Budzikiewicz, H. and Thonart, P. (2003) Fluorescent *Pseudomonas* mainly produce the dihydroform of pyoverdine at low specific growth rate. *Letters in Applied Microbiology*, 36 (5), pp. 259-262.
- Jaques, S. and McCarter, L.L. (2006) Three new regulators of swarming in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 188 (7), pp. 2625-2635.
- Jiménez, J.I., Minambres, B., García, J.L. and Díaz, E. (2002) Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 4 (12), pp. 824-841.
- Johnsen, K., Jacobsen, C.S., Torsvik, V. and Sorensen, J. (2001) Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils - A review. *Biology and Fertility of Soils*, 33 (6), pp. 443-453.
- Jonas, K., Edwards, A.N., Simm, R., Romeo, T., Römling, U. and Melefors, O. (2008) The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins. *Molecular Microbiology*, 70 (1), pp. 236-257.
- Jones, D.L., Dennis, P.G., Owen, A.G. and Van Hees, P.A.W. (2003) Organic acid behavior in soils - Misconceptions and knowledge gaps. *Plant and Soil*, 248 (1-2), pp. 31-41.
- Jussila, M.M., Jurgens, G., Lindstrom, K. and Suominen, L. (2006) Genetic diversity of culturable bacteria in oil-contaminated rhizosphere of *Galega orientalis*. *Environmental Pollution*, 139 (2), pp. 244-257.
- Kader, A., Simm, R., Gerstel, U., Morr, M. and Römling, U. (2006) Hierarchical involvement of various GGDEF domain proteins in rdar morphotype development of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology*, 60 (3), pp. 602-616.

- Kaiser, D. (2007)** Bacterial swarming: A re-examination of cell-movement patterns. *Current Biology*, 17 (14).
- Kamath, R., Schnoor, J.L. and Álvarez, P.J.J. (2004)** Effect of root-derived substrates on the expression of *nah-lux* genes in *Pseudomonas fluorescens* HK44: implications for PAH biodegradation in the rhizosphere. *Environmental Science and Technology*, 38 (6), pp. 1740-1745.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M.A. and Denny, T.P. (2002)** *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Molecular Microbiology*, 46 (2), pp. 427-437.
- Kazmierczak, B.I., Lebron, M.B. and Murray, T.S. (2006)** Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 60 (4), pp. 1026-1043.
- Kierek-Pearson, K. and Karatan, E. (2005)** Biofilm development in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 57, pp. 79-111.
- Kim, Y. C., Miller, C.D. and Anderson, A.J. (2000)** Superoxide dismutase activity in *Pseudomonas putida* affects utilization of sugars and growth on root surfaces. *Appl. Environmental Microbiology*, 66, pp.1460-1467.
- Kim, W. and Surette, M.G. (2003)** Swarming populations of *Salmonella* represent a unique physiological state coupled to multiple mechanisms of antibiotic resistance. *Biological Procedures Online*, 5 (1), pp. 189-196.
- Kim, Y.K. and McCarter, L.L. (2007)** ScrG, a GGDEF-EAL protein, participates in regulating swarming and sticking in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Bacteriology*, 189 (11), pp. 4094-4107.
- Kim, M.S., Cho, S.M., Kang, E.Y., Im, Y.J., Hwangbo, H., Kim, Y.C., et al. (2008)** Galactinol is a signaling component of the induced systemic resistance caused by *Pseudomonas chlororaphis* O6 root colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21 (12), pp. 1643-1653.
- Klauck, E., Typas, A. and Hengge, R. (2007)** The sigmaS subunit of RNA polymerase as a signal integrator and network master regulator in the general stress response in *Escherichia coli*. *Science Progress* 90, pp. 103-127.
- Klausen, M., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003a)** Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Molecular Microbiology*, 50 (1), pp. 61-68.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003b)** Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48 (6), pp. 1511-1524.
- Knirel, Y.A., Lindner, B., Vinogradov, E.V., Kocharova, N.A., Senchenkova, S.N., Shaikhutdinova, R.Z., et al. (2005)** Temperature-dependent variations and intraspecies diversity of the structure of the lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*. *Biochemistry*, 44 (5), pp. 1731-1743.

Köhler, T., Curty, L.K., Barja, F., Van Delden, C. and Pechere, J.C. (2000) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *Journal of Bacteriology*, 182 (21), pp. 5990-5996.

Kollmeier, M., Dietrich, P., Bauer, C.S., Horst, W.J. and Hedrich R. (2001) Aluminum activates a citrate-permeable anion channel in the aluminum-sensitive zone of the maize root apex. A comparison between an aluminum-sensitive and an aluminum-resistant cultivar. *Plant Physiology*, 126 (1), pp. 397-410.

Kovacs Jr. M.F. (1971) Identification of aliphatic and aromatic acids in root and seed exudates of peas, cotton, and barley. *Plant and Soil*, 34 (1), pp. 441-451.

Kowalchuk, G.A., Buma, D.S., De Boer, W., Klinkhamer, P.G.L. and Van Veen, J.A. (2002) Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81 (1-4), pp. 509-520.

Kuchma, S.L., Brothers, K.M., Merritt, J.H., Liberati, N.T., Ausubel, F.M. and O'Toole, G.A. (2007) BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Journal of Bacteriology*, 189 (22), pp. 8165-8178.

Kuiper, I., Bloemberg, G.V., Noreen, S., Thomas-Oates, J.E. and Lugtenberg, B.J.J. (2001) Increased uptake of putrescine in the rhizosphere inhibits competitive root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14 (9), pp. 1096-1104.

Kulasakara, H., Lee, V., Brencic, A., Liberati, N., Urbach, J., Miyata, S., Lee, D.G., *et al.* (2006) Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclases and phosphodiesterases reveals a role for bis-(3'-5')-cyclic-GMP in virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (8), pp. 2839-2844.

Kumar, M. and Chatterji, D. (2008) Cyclic di-GMP: A second messenger required for long-term survival, but not for biofilm formation, in *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology*, 154 (10), pp. 2942-2955.

Lam, S.T., Ellis, D.M. and Ligon, J.M. (1990) Genetic approaches for studying rhizosphere colonization. *Plant and Soil*, 129 (1), pp. 11-18.

Lam, J.S., Matewish, M. and Poon, K.K.H. (2004) Lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. In Ramos, J.L. (ed.) *Pseudomonas: Biosynthesis of Macromolecules and Molecular Metabolism*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Vol. III, pp. 3-51.

Langlois, P., Bourassa, S., Poirier, G.G. and Beaulieu, C. (2003) Identification of *Streptomyces coelicolor* proteins that are differentially expressed in the presence of plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (4), pp. 1884-1889.

Lasa, I. (2006) Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International Microbiology*, 9 (1), pp. 21-28.

Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J.M., Gamazo, C., Penades, J.R. and Lasa, I. (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Molecular Microbiology*, 58 (5), pp. 1322-1339.

- Lee, K.J. and Gaskins, M.H. (1982) Increased root exudation of ^{14}C -compounds by sorghum seedlings inoculated with nitrogen-fixing bacteria. *Plant and Soil*, 69 (3), pp. 391-399.
- Lee, J. and Cooper, B. (2006) Alternative workflows for plant proteomic analysis. *Molecular BioSystems*, 2 (12), pp. 621-626.
- Lee, V.T., Matewish, J.M., Kessler, J.L., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Lory S. (2007) A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular Microbiology*, 65 (6), pp. 1474-1484.
- Leeman, M., Den Ouden, F. M., Van Pelt, J. A., Dirkx, F. P. M., Steijl, H., Bakker, P. A. H. M. and Schippers, B. (1996) Iron availability affects induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, 86, pp. 149-155.
- Lemanceau, P., Bakker, P.A.H.M., De Kogel, W.J., Alabouvette, C. and Schippers, B. (1993) Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (1), pp. 74-82.
- Ligon, J.M., Hill, D.S., Hammer, P.E., Torkewitz, N.R., Hofmann, D., Kempf, H.J. and Van Pee, K.H. (2000) Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science*, 56 (8), pp. 688-695.
- Lim, B., Beyhan, S., Meir, J. and Yildiz, F.H. (2006) Cyclic-diGMP signal transduction systems in *Vibrio cholerae*: Modulation of rugosity and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 60 (2), pp. 331-348.
- Lim, B., Beyhan, S. and Yildiz, F.H. (2007) Regulation of *Vibrio polysaccharide* synthesis and virulence factor production by CdgC, a GGDEF-EAL domain protein, in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 189 (3), pp. 717-729.
- Liszakay, A., Van Der Zalm, E. and Schopfer, P. (2004) Production of reactive oxygen intermediates (O_2^- , H_2O_2 , and $\cdot\text{OH}$) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiology*, 136 (2), pp. 3114-3123.
- Liu, S., Hu, X., Lohrke, S.M., Baker, C.J., Buyer, J.S., de Souza, J.T. and Roberts D.P. (2007) Role of *sdhA* and *pfkA* and catabolism of reduced carbon during colonization of cucumber roots by *Enterobacter cloacae*. *Microbiology*, 153 (9), pp. 3196-3209.
- Lohrke, S.M., Dery, P.D., Li, W., Reedy, R., Kobayashi, D.Y. and Roberts, D.P. (2002) Mutation of *rpiA* in *Enterobacter cloacae* decreases seed and root colonization and biocontrol of damping-off caused by *Pythium ultimum* on cucumber. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15 (8), pp. 817-825.
- López de Victoria, G. and Lovell, C.R. (1993) Chemotaxis of *Azospirillum* species to aromatic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (9), pp. 2951-2955.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193, pp. 265-273.

Loyola-Vargas, V.M., Broeckling, C.D., Badri D. and Vivanco J.M. (2007) Effect of transporters on the secretion of phytochemicals by the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 225 (2), pp. 301-310.

Lübeck, P.S., Hansen, M. and Sørensen, J. (2000) Simultaneous detection of the establishment of seed-inoculated *Pseudomonas fluorescens* strain DR54 and native soil bacteria on sugar beet root surfaces using fluorescence antibody and *in situ* hybridization technique. *FEMS Microbiology Ecology* 33, 11-19.

Lugtenberg, B.J.J. and Dekkers L.C. (1999) What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology*, 1 (1), pp. 9-13.

Lugtenberg, B.J., Kravchenko, L.V. and Simons, M. (1999) Tomato seed and root exudate sugars: composition, utilization by *Pseudomonas* biocontrol strains and role in rhizosphere colonization. *Environmental microbiology*, 1 (5), pp. 439-446.

Lugtenberg, B.J.J., Dekkers, L. and Bloemberg, G.V. (2001) Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annual Review of Phytopathology*, 39, pp. 461-490.

Lugtenberg, B.J.J. and Bloemberg, G.V. (2004) Life in the rhizosphere. In Ramos, J.L. (ed.) *Pseudomonas: Genomics, life style and molecular architecture*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, Vol. I, pp. 403-430.

Lugtenberg, B.J.J. and Leveau, J.H.J. (2007) Biocontrol of plant pathogens: principles, promises, and pitfalls. In Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. (eds.) *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, New York, pp. 267-296

Lynch, J.M. and Whipps, J.M. (1990) Substrate flow in the rhizosphere. *Plant and Soil*, 129 (1), pp. 1-10.

Magalhaes, J.V., Liu, J., Guimaraes, C.T., Lana, U.G.P., Alves, V.M.C., Wang, Y.H., *et al.* (2007) A gene in the multidrug and toxic compound extrusion (MATE) family confers aluminum tolerance in sorghum. *Nature Genetics*, 39 (9), pp. 1156-1161.

Makin, S.A. and Beveridge, T.J. (1996) *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 ceases to express serotype-specific lipopolysaccharide at 45°C. *Journal of Bacteriology*, 178 (11), pp. 3350-3352.

Malone, J.G., Williams, R., Christen, M., Jenal, U., Spiers, A.J. and Rainey, P.B. (2007) The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology*, 153 (4), pp. 980-994.

Marchler-Bauer, A., Anderson, J.B., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Deweese-Scott, C., Fong, J.H., *et al.* (2009) CDD: Specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research*, 37 (SUPPL. 1).

Marilley, L., Hartwig, U.A. and Aragno M. (1999) Influence of an elevated atmospheric CO₂ content on soil and rhizosphere bacterial communities beneath *Lolium perenne* and *Trifolium repens* under field conditions. *Microbial Ecology*, 38 (1), pp. 39-49.

Mark, G.L., Dow, J.M., Kiely, P.D., Higgins, H., Haynes, J., Baysse, C., *et al.* (2005) Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes

involved in microbe-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (48), pp. 17454-17459.

Marschner, P. and Crowley, D.E. (1996) Physiological activity of a bioluminescent *Pseudomonas fluorescens* (strain 2-79) in the rhizosphere of mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.). *Soil Biology & Biochemistry* 28, 869-876.

Marschner, P., Yang, C.-H., Lieberei, R. and Crowley, D.E. (2001) Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33 (11), pp. 1437-1445.

Martínez-Granero, F., Capdevila, S., Sánchez-Contreras, M., Martín, M. and Rivilla, R. (2005) Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, 151 (3), pp. 975-983.

Martínez-Granero, F., Rivilla, R. and Martín, M. (2006) Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (5), pp. 3429-3434.

Martínez-Wilson, H.F., Tamayo, R., Tischler, A.D., Lazinski, D.W. and Camilli, A. (2008) The *vibrio cholerae* hybrid sensor kinase *vieS* contributes to motility and biofilm regulation by altering the cyclic diguanylate level. *Journal of Bacteriology*, 190 (19), pp. 6439-6447.

Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., et al. (2002) Multifunctionality of plant ABC transporters - More than just detoxifiers. *Planta*, 214 (3), pp. 345-355.

Matilla, M.A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J.J., Ramos, J.L. and Ramos-Gonzalez, M.I. (2007a) Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biology*, 8 (9), art. no. R179.

Matilla, M.A., Ramos, J.L., Duque, E., De Dios Alche, J., Espinosa-Urgel, M. and Ramos-Gonzalez, M.I. (2007b) Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environmental Microbiology*, 9 (7), pp. 1842-1850.

Matilla, M.A., Ramos, J.L., Bakker, P.A.H.M., Doornbos, R., Badri, D.V., Vivanco, J.M. and Ramos-González, M.I. (2010) *Pseudomonas putida* KT2440 causes induced systemic resistance (ISR) and changes in Arabidopsis root exudation. *Environmental Microbiology Reports*. En prensa.

Matsushita, K., Ohnishi, T. and Kaback, H. R. (1987) NADH-ubiquinone oxidoreductases of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *Biochemistry*, 26, 7732-7737.

Matthysse, A.G. and McMahan, S. (1998) Root colonization by *Agrobacterium tumefaciens* is reduced in *cel*, *attB*, *attD*, and *attR* mutants. *Applied and Environmental Microbiology*, 64 (7), pp. 2341-2345.

Matthysse, A.G., Marry, M., Krall, L., Kaye, M., Ramey, B.E., Fuqua, C. and White A.R. (2005) The effect of cellulose overproduction on binding and biofilm formation on roots by *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (9), pp. 1002-1010.

- Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. and Défago, G. (1995) Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced antibiotic production. *Plant Pathology*, 44, pp.40–50.
- Maurhofer, M., Reimmann, C., Schmidli-Sacherer, P., Heeb, S., Haas, D. and Défago, G. (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, 88, pp. 678-684.
- McCarthy, Y., Ryan, R.P., O'Donovan, K., He, Y.Q., Jiang, B.L., Feng, J.X., *et al.* (2008) The role of PilZ domain proteins in the virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris*. *Molecular Plant Pathology*, 9 (6), pp. 819-824.
- McGroarty, E.J. and Rivera, M. (1990) Growth-dependent alterations in production of serotype-specific and common antigen lipopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Infection and Immunity*, 58 (4), pp. 1030-1037.
- McLean, R.J.C., Whiteley, M., Stickler, D.J. and Fuqua W.C. (1997) Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 154 (2), pp. 259-263.
- Meharg, A.A. and Killham, K. (1991) A novel method of quantifying root exudation in the presence of soil microflora. *Plant and Soil*, 133 (1), pp. 111-116.
- Meharg, A.A. and Killham, K. (1995) Loss of exudates from the roots of perennial ryegrass inoculated with a range of micro-organisms. *Plant and Soil*, 170 (2), pp. 345-349.
- Mejía-Ruíz, H., Guzmán, J., Moreno, S., Soberón-Chávez, G. and Espín, G. (1997) The *Azotobacter vinelandii* *alg8* and *alg44* genes are essential for alginate synthesis and can be transcribed from an *algD*-independent promoter. *Gene*, 199 (1-2), pp. 271-277.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervas, A. and Jiménez-Díaz, R.M. (2004) Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biological Control*, 30 (2), pp. 474-486.
- Mercado-Blanco, J. and Bakker, P.A.H.M. (2007) Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: Exploiting bacterial traits for crop protection. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 92 (4), pp. 367-389.
- Merighi, M., Lee, V.T., Hyodo, M., Hayakawa, Y. and Lory, S. (2007) The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 65 (4), pp. 876-895.
- Meyer, J.M. and Abdallah, M.A. (1978) The fluorescent pigment of *Pseudomonas fluorescens*: Biosynthesis, purification and physicochemical properties. *Journal of General Microbiology*, 107 (2), pp. 319-328
- Meziane, H., Van der Sluis, I., van Loon, L. C., Höfte, M. and Bakker, P. A. H. M. (2005) Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, 6, pp. 177-185.

- Micallef, S.A., Shiaris, M.P. and Colon-Carmona, A.** (2009) Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of Experimental Botany*, 60 (6), pp. 1729-1742.
- Miché, L., Belkin, S., Rozen, R. and Balandreau, J.** (2003) Rice seedling whole exudates and extracted alkylresorcinols induce stress-response in *Escherichia coli* biosensors. *Environmental Microbiology*, 5 (5), pp. 403-411.
- Miethke, M. and Marahiel, M.A.** (2007) Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71 (3), pp. 413-451.
- Miller, K.J. and Wood, J.M.** (1996) Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 50, pp. 101-136.
- Mirleau, P., Delorme, S., Philippot, L., Meyer, J.M., Mazurier, S. and Lemanceau, P.** (2000) Fitness in soil and rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. *FEMS Microbiology Ecology*, 34 (1), pp. 35-44.
- Molin, S. and Givskov, M.** (1999) Application of molecular tools for *in situ* monitoring of bacterial growth activity. *Environmental microbiology*, 1 (5), pp. 383-391.
- Molina, L.A., Ramos, C., Duque, E., Ronchel, M.C., García, J.M., Wyke, L. and Ramos, J.L.** (2000) Survival of *Pseudomonas putida* KT2440 in soil and in the rhizosphere of plants under greenhouse and environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 32 (3), pp. 315-321.
- Molina, M.A., Godoy, P., Ramos-González, M.I., Muñoz, N., Ramos, J.L. and Espinosa-Urgel, M.** (2005) Role of iron and the TonB system in colonization of corn seeds and roots by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 7 (3), pp. 443-449.
- Molina, M.A., Ramos, J.L. and Espinosa-Urgel, M.** (2006) A two-partner secretion system is involved in seed and root colonization and iron uptake by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 8 (4), pp. 639-647.
- Molina-Henares, M.A., García-Salamanca, A., Molina-Henares, A.J., de la Torre, J., Herrera, M.C., Ramos, J.L. and Duque, E.** (2009). Functional analysis of aromatic biosynthetic pathways in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial Biotechnology*, 2 (1), pp. 91-100.
- Monds, R.D., Newell, P.D., Gross, R.H. and O'Toole, G.A.** (2007) Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Molecular Microbiology*, 63 (3), pp. 656-679.
- Monds, R.D. and O'Toole G.A.** (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*, 17 (2), pp. 73-87.
- Morales, G., Ugidos, A. and Rojo, F.** (2006) Inactivation of the *Pseudomonas putida* cytochrome o ubiquinol oxidase leads to a significant change in the transcriptome and to increased expression of the CIO and cbb3-1 terminal oxidases. *Environmental Microbiology* 8 (10), pp. 1764-1774.

- Morgan, J.A.W., Bending, G.D. and White, P.J.** (2005) Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 56 (417), pp. 1729-1739.
- Mühling K.H., Schubert S. and Mengel K.** (1993) Mechanism of sugar retention by roots of intact maize and field bean plants. *Plant and Soil*, 155-156 (1), pp. 99-102.
- Muñoz-Rojas, J. and Ramos, J.L.** (2006) Bacterias recombinantes que permiten crecer a plantas en suelos salinos. Patente española con número de solicitud P200602012.
- Nadell, C.D., Xavier, J.B. and Foster, K.R.** (2009) The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (1), pp. 206-224.
- Nakhamchik, A., Wilde, C. and Rowe-Magnus D.A.** (2008) Cyclic-di-GMP regulates extracellular polysaccharide production, biofilm formation, and rugose colony development by *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (13), pp. 4199-4209.
- Navarro, M.V.A.S., De, N., Bae, N., Wang, Q. and Sondermann, H.** (2009) Structural Analysis of the GGDEF-EAL Domain-Containing c-di-GMP Receptor FimX. *Structure*, 17 (8), pp. 1104-1116.
- Navazo, A., Barahona, E., Redondo-Nieto, M., Martínez-Granero, F., Rivilla, R. and Martín, M.** (2009) Three independent signalling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial Biotechnology* (2009) 2(4), pp. 489-498.
- Nelson, K.E., Weinel, C., Paulsen, I.T., Dodson, R.J., Hilbert, H., Martins dos Santos, V.A.P., et al.** (2002) Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440 *Environmental Microbiology*, 4 (12), pp. 799-808.
- Neumann, G. and Römheld, V.** (2007) The release of root exudates as affected by the plant physiological status. In Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. (eds.) *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, New York, pp. 23-72.
- Newell, P.D., Monds, R.D. and O'Toole G.A.** (2009) LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (9), pp. 3461-3466.
- Normander, B., Hendriksen, N.B. and Nybroe, O.** (1999) Green fluorescent protein marked *Pseudomonas fluorescens*: localization, viability, and activity in the natural barley rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4646-4651.
- Nyström, T. and Neidhardt, F.C.** (1994) Expression and role of the universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* during growth arrest. *Molecular Microbiology*, 11 (3), pp. 537-544.
- Oglesby, L.L., Jain, S. and Ohman, D.E.** (2008) Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology*, 154 (6), pp. 1605-1615.
- Ongena, M. and Jacques, P.** (2007) *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16 (3), pp. 115-125.

O'Shea, T.M., Klein, A.H., Geszvain, K., Wolfe, A.J. and Visick, K.L. (2006) Diguanylate cyclases control magnesium-dependent motility of *Vibrio fischeri*. *Journal of Bacteriology*, 188 (23), pp. 8196-8205.

O'Toole, G.A. and Kolter, R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28, pp. 449-461.

Parker, J.S., Cavell, A.C., Dolan, L., Roberts, K. and Grierson, C.S. (2000) Genetic interactions during root hair morphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12, pp. 1961-1974.

Patriquin, G.M., Banin, E., Gilmour, C., Tuchman, R., Greenberg, E.P. and Poole, K. (2008) Influence of quorum sensing and iron on twitching motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 190 (2), pp. 662-671.

Paul, R., Weiser, S., Amiot, N.C., Chan, C., Schirmer, T., Giese, B. and Jenal, U. (2004) Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes and Development*, 18 (6), pp. 715-727.

Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerklotz, H. and Jenal, U. (2007) Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (40), pp. 29170-29177.

Percival, S.L., Knapp, J.S., Wales, D.S. and Edyvean, R.G.J. (1999) The effect of turbulent flow and surface roughness on biofilm formation in drinking water. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 22 (3), pp. 152-159.

Perry, R.D., Bobrov, A.G., Kirillina, O., Jones, H.A., Pedersen, L., Abney, J. and Fetherston, J.D. (2004) Temperature regulation of the Hemin storage (Hms+) phenotype of *Yersinia pestis* is posttranscriptional. *Journal of Bacteriology*, 186 (6), pp. 1638-1647.

Perry, L.G., Alford, E.R., Horiuchi, J., Paschke, M.W. and Vivanco, J.M. (2007) Chemical signals in the rhizosphere: root-root and root-microbe communication. In Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. (eds.) *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, New York, pp. 297-330.

Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A. and Hengge R. (2008) Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes and Development*, 22 (17), pp. 2434-2446.

Peters, N.K., Frost, J.W. and Long, S.R. (1986) A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, 233 (4767), pp. 977-980.

Phillips, D.A., Fox, T.C., King, M.D., Bhuvaneshwari, T.V. and Teuber, L.R. (2004) Microbial products trigger amino acid exudation from plant roots. *Plant physiology*, 136 (1), pp. 2887-2894.

Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Hoffland, E., Van Pelt, J. A. and Van Loon, L. C. (1996) Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, 8, pp. 1225-1237.

Pieterse, C. M. J., Van Wees, S. C. M., Van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., *et al.* (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10, pp. 1571-1580.

Pieterse, C. M. J., Van Pelt, J. A., Ton, J., Parchmann, S., Mueller, M. J., Buchala, A. J., *et al.* (2000) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 57, pp. 123-134.

Pliego, C., Cazorla, F.M., Gonzalez-Sanchez, M.A., Perez-Jimenez, R.M., de Vicente, A. and Ramos, C. (2007) Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Research in Microbiology*, 158 (5), pp. 463-470.

Poonguzhali, S., Madhaiyan, M., Yim, W.J., Kim, K.A. and Sa, T.M. (2008) Colonization pattern of plant root and leaf surfaces visualized by use of green-fluorescent-marked strain of *Methylobacterium suomiense* and its persistence in rhizosphere. *Applied Microbiology and Biotechnology* 78 (6), pp. 1033-1043.

Pratt, L.A. and Kolter, R. (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30 (2), pp. 285-293.

Pratt, J.T., Tamayo, R., Tischler, A.D. and Camilli, A. (2007) PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (17), pp. 12860-12870.

Preston, G.M., Bertrand, N. and Rainey, P.B. (2001) Type III secretion in plant growth-promoting *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Molecular Microbiology*, 41 (5), pp. 999-1014.

Preston, G.M. (2004) Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359 (1446), pp. 907-918.

Preston, G.M. (2007) Metropolitan Microbes: Type III Secretion in Multihost Symbionts. *Cell Host and Microbe*, 2 (5), pp. 291-294.

Prikryl, Z. and Vancura, V. (1980) Root exudates of plants - VI. Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant and Soil*, 57 (1), pp. 69-83.

Raaijmakers, J.M., Leeman, M., Van Oorschot, M.M.P., Van der Sluis, I., Schippers, B. and Bakker, P.A.H.M. (1995) Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 85, pp. 1075-1081.

Raaijmakers, J.M., Vlami, M. and de Souza J.T. (2002) Antibiotic production by bacterial biocontrol agents. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81 (1-4), pp. 537-547.

Rahman, M., Simm, R., Kader, A., Basseres, E., Römling, U. and Mollby, R. (2007) The role of c-di-GMP signaling in an *Aeromonas veronii* biovar *sobria* strain. *FEMS Microbiology Letters*, 273 (2), pp. 172-179.

Rainey, P.B. (1999) Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environmental Microbiology*, 1 (3), pp. 243-257.

Ramelot, T.A., Yee, A., Cort, J.R., Semesi, A., Arrowsmith, C.H. and Kennedy, M.A. (2007) NMR structure and binding studies confirm that PA4608 from *Pseudomonas aeruginosa* is a PilZ domain and a c-di-GMP binding protein. *Proteins: Structure, Function and Genetics*, 66 (2), pp. 266-271.

Ramey, B.E., Koutsoudis, M., Bodman, S.B.V. and Fuqua, C. (2004a) Biofilm formation in plant-microbe associations. *Current Opinion in Microbiology*, 7 (6), pp. 602-609.

Ramey, B.E., Matthyse, A.G. and Fuqua, C. (2004b) The FNR-type transcriptional regulator SinR controls maturation of *Agrobacterium tumefaciens* biofilms. *Molecular Microbiology*, 52 (5), pp. 1495-1511.

Ramos, C., Molbak, L. and Molin, S. (2000a) Bacterial activity in the rhizosphere analyzed at the single-cell level by monitoring ribosome contents and synthesis rates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (2), pp. 801-809.

Ramos, C., Molina, L., Molbak, L., Ramos, J.L. and Molin, S. (2000b) A bioluminescent derivative of *Pseudomonas putida* KT2440 for deliberate release into the environment. *FEMS Microbiology Ecology*, 34 (2), pp. 91-102.

Ramos-González, M.I., Campos, M.J. and Ramos, J.L. (2005) Analysis of *Pseudomonas putida* KT2440 gene expression in the maize rhizosphere: In vitro expression technology capture and identification of root-activated promoters. *Journal of Bacteriology*, 187 (12), pp. 4033-4041.

Ramos-González, M.I., Campos, M.J., Ramos, J.L. and Espinosa-Urgel (2006) Characterization of *Pseudomonas putida* mobile genetic element IS $Ppu10$: an occupant of repetitive extragenic palindromic sequence. *Journal of Bacteriology*, 188: pp. 37-44.

Ran, L.X., van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. (2005) No role for bacterially produced salicylic acid in rhizobacterial induction of systemic resistance in *Arabidopsis*. *Phytopathology*, 95 (11), pp. 1349-1355.

Rao, F., Yang, Y., Qi, Y. and Liang, Z.X. (2008) Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: A study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 190 (10), pp. 3622-3631.

Rao, F., Qi, Y., Chong, H.S., Kotaka, M., Li, B., Li, J., *et al.* (2009) The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase. *Journal of Bacteriology*, 191 (15), pp. 4722-4731.

Rather, P.N. (2005) Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *Environmental Microbiology*, 7 (8), pp. 1065-1073.

Read, D.B., and Gregory, P.J. (1997) Surface tension and viscosity of axenic maize and lupin mucilages. *New Phytologist* 137, pp. 623-628.

Read, D.B., Bengough, A.G., Gregory, P.J., Crawford, J.W., Robinson, D., Scrimgeour, C.M., *et al.* (2003) Plant roots release phospholipid surfactants that modify the physical and chemical properties of soil. *New Phytologist*, 157 (2), pp. 315-326.

Recep, K., Fikretin, S., Erkol, D. and Cafer, E. (2009) Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains. *Biological Control* 50 (2), pp. 194-198.

- Rediers, H., Bonnacarrere, V., Rainey, P.B., Hamonts, K., Vanderleyden, J. and De Mot R. (2003) Development and Application of a *dapB*-Based In Vivo Expression Technology System to Study Colonization of Rice by the Endophytic Nitrogen-Fixing Bacterium *Pseudomonas stutzeri* A15. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (11), pp. 6864-6874.
- Riedel, C.U., Monk, I.R., Casey, P.G., Waidmann, M.S., Gahan, C.G.M. and Hill, C. (2009) AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 71 (5), pp. 1177-1189.
- Roberts, D.P., Dery, P.D., Yucel, I., Buyer, J., Holtman, M.A. and Kobayashi, D.Y. (1999) Role of *pfkA* and general carbohydrate catabolism in seed colonization by *Enterobacter cloacae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (6), pp. 2513-2519.
- Roberts, D.P., Dery, P.D., Yucel, I. and Buyer J.S. (2000) Importance of *pfkA* for rapid growth of *Enterobacter cloacae* during colonization of crop seeds. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1), pp. 87-91.
- Roberts, D.P., Baker, C.J., McKenna, L., Liu, S., Buyer, J.S. and Kobayashi, D.Y. (2009) Influence of host seed on metabolic activity of *Enterobacter cloacae* in the spermosphere. *Soil Biology and Biochemistry* 41 (4), pp. 754-761.
- Rodríguez, H. and Fraga, R. (1999) Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 17 (4-5), pp. 319-339.
- Rodríguez-Herva, J.J., Duque, E., Molina-Henares, M.A., Navarro-Avilés, G., van Dillewijn, P., de la Torre, J., *et al.* (2009) Physiological and transcriptomic characterization of a *fliA* mutant of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology Reports*. En prensa.
- Römling, U., Gomelsky, M. and Galperin, M.Y. (2005) C-di-GMP: The dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular Microbiology*, 57 (3), pp. 629-639.
- Römling, U., and Amikam, D. (2006) Cyclic di-GMP as a second messenger. *Cur Opin Microbiol* 9: 218-228.
- Römling, U. (2009) Rationalizing the Evolution of EAL Domain-Based Cyclic di-GMP-Specific Phosphodiesterases. *Journal of Bacteriology*, 191 (15), pp. 4697-4700.
- Rosas, S.B., Andres, J.A., Rovera, M. and Correa, N.S. (2006) Phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia-legume symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry*, 38 (12), pp. 3502-3505.
- Ross, P., Aloni, Y., Weinhouse, H., Michaeli, D., Ohana, P., Mayer, R. and Benziman, M. (1985) An unusual guanyl oligonucleotide regulates cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum*. *FEBS Letters*, 186, pp. 191-196.
- Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Ohana, P., Mayer, R., *et al.* (1987) Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature*, 325, pp. 279-281.
- Ross, P., Mayer, R. and Benziman, M. (1991) Cellulose biosynthesis and function in bacteria. *Microbiological Reviews*, 55 (1).

- Roux, A., Beloin, C. and Ghigo, J.M.** (2005) Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: Application to identification of new *Escherichia coli* adhesins. *Journal of Bacteriology*, 187 (3), pp. 1001-1013.
- Rovira, A.D.** (1969) Plant root exudates. *The Botanical Review*, 35 (1), pp. 35-57.
- Rudrappa, T., Quinn, W.J., Stanley-Wall, N.R. and Bais, H.P.** (2007) A degradation product of the salicylic acid pathway triggers oxidative stress resulting in down-regulation of *Bacillus subtilis* biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*, 226 (2), pp. 283-297.
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M.L. and Bais, H.P.** (2008) Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 64 (2), pp. 153-166.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Crossman, L.C., Spiro, S., He, Y.W., et al.** (2006) Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (17), pp. 6712-6717.
- Ryan, R.P., Fouhy, Y., Lucey, J.F., Jiang, B.L., He, Y.Q., Feng, J.X., Tang, J.L. et al.** (2007) Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Microbiology*, 63 (2), pp. 429-442.
- Ryan, R.P., Lucey, J., O'Donovan, K., McCarthy, Y., Yang, L., Tolker-Nielsen, T. and Dow, J.M.** (2009) HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental Microbiology* 11 (5), pp. 1126-1136.
- Ryder, C., Byrd, M. and Wozniak, D.J.** (2007) Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Current Opinion in Microbiology*, 10 (6), pp. 644-648.
- Ryjenkov, D.A., Tarutina, M., Moskvina, O.V. and Gomelsky, M.** (2005) Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: Insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *Journal of Bacteriology*, 187 (5), pp. 1792-1798.
- Ryjenkov, D.A., Simm, R., Romling, U. and Gomelsky, M.** (2006) The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (41), pp. 30310-30314.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Wei, H.X., Pare, P.W. and Kloepper, J.W.** (2003a) Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (8), pp. 4927-4932.
- Ryu, C.M., Hu, C.H., Reddy, M.S. and Kloepper, J.W.** (2003b) Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist*, 160 (2), pp. 413-420.
- Ryu, C.M., Farag, M.A., Hu, C.H., Reddy, M.S., Kloepper, J.W. and Pare, P.W.** (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134 (3), pp. 1017-1026.

- Sakaguchi, T., Nishizawa, N.K., Nakanishi, H., Yoshimura, E. and Mori, S. (1999) The role of potassium in the secretion of mugineic acids family phytosiderophores from iron-deficient barley roots. *Plant and Soil*, 215 (2), pp. 221-227.
- Sakuragi, Y. and Kolter, R. (2007) Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 189 (14), pp. 5383-5386.
- Samuels A.L., Fernando M. and Glass A.D.M. (1992) Immunofluorescent localization of plasma membrane H⁺-ATPase in barley roots and effects of K nutrition. *Plant Physiology*, 99 (4), pp. 1509-1514.
- Sánchez-Contreras, M., Martín, M., Villaceros, M., O'Gara, F., Bonilla, I. and Rivilla R. (2002) Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *Pseudomonas fluorescens* F113. *Journal of Bacteriology*, 184 (6), pp. 1587-1596.
- Sasaki, T., Yamamoto, Y., Ezaki, B., Katsuhara, M., Ahn, S.J., Ryan, P.R., *et al.* (2004) A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant Journal*, 37 (5), pp. 645-653.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. and Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184, pp.1140–1154.
- Schaller, G. (1987) pH changes in the rhizosphere in relation to the pH-buffering of soils. *Plant and Soil*, 97 (3), pp. 439-444.
- Scher, F.M., Kloepper, J.W. and Singleton, C.A. (1988) Chemotaxis of fluorescent *Pseudomonas* spp. to soybean seed exudates *in vitro* and in soil. *Canadian Journal Microbiology*, 31, 570-574.
- Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A. and Gomelsky, M. (2005) The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically active and inactive EAL domains. *Journal of Bacteriology*, 187 (14), pp. 4774-4781.
- Schuhegger, R., Ihring, A., Gantner, S., Bahnweg, G., Knappe, C., Vogg, G., *et al.* (2006) Induction of systemic resistance in tomato by N-acyl-L-homoserine lactone-producing rhizosphere bacteria. *Plant, Cell and Environment*, 29 (5), pp. 909-918.
- Schwyn, B. and Neilands, J.B. (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160 (1), pp. 47-56.
- Shaw, L.J., Morris, P. and Hooker, J.E. (2006) Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology*, 8 (11), pp. 1867-1880.
- Shen, H., He, L.F., Sasaki, T., Yamamoto, Y., Zheng, S.J., Ligaba, A., *et al.* (2005) Citrate secretion coupled with the modulation of soybean root tip under aluminum stress. Up-regulation of transcription, translation, and threonine-oriented phosphorylation of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 138 (1), pp. 287-296.
- Shepherd, T. and Davies, H.V. (1994) Effect of exogenous amino acids, glucose and citric acid on the patterns of short-term accumulation and loss of amino acids in the root-zone of sand-cultured forage rape (*Brassica napus* L.). *Plant and Soil*, 158 (1), pp. 111-118.

- 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 (5), pp. 1264-1277.
- Silby, M.W., Cerdeño-Tárraga, A.M., Vernikos, G.S., Giddens, S.R., Jackson, R.W., Preston, G.M., *et al.* (2009) Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biology* 10 (5), art. no. R51.
- Simm, R., Morr, M., Kader, A., Nimtz, M. and Römling, U. (2004) GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Molecular Microbiology*, 53 (4), pp. 1123-1134.
- Simons, M., Van Der Bij, A.J., Brand, I., De Weger, L.A., Wijffelman, C.A. and Lugtenberg, B.J.J. (1996) Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9 (7), pp. 600-607.
- Simons, M., Permentier, H.P., De Weger, L.A., Wijffelman, C.A. and Lugtenberg B.J.J. (1997) Amino acid synthesis is necessary for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens* strain WCS365. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10 (1), pp. 102-106.
- Slater, H., Crow, M., Everson, L. and Salmond, G.P.C. (2003) Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Molecular Microbiology*, 47 (2), pp. 303-320.
- Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Kaiser, S., *et al.* (2001) Bulk and Rhizosphere Soil Bacterial Communities Studied by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis: Plant-Dependent Enrichment and Seasonal Shifts Revealed. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10), pp. 4742-4751.
- Söderberg, M.A., Rossier, O. and Cianciotto, N.P. (2004) The type II protein secretion system of *Legionella pneumophila* promotes growth at low temperatures. *Journal of Bacteriology*, 186, 3712-3720.
- Sola-Landa, A., Moura, R.S. and Martin, J.F. (2003) The two-component PhoR-PhoP system controls both primary metabolism and secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces lividans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (10), pp. 6133-6138.
- Solano, C., García, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J.M., Gamazo, C. and Lasa, I. (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: Critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*, 43 (3), pp. 793-808.
- Solano, C., García, B., Latasa, C., Toledo-Arana, A., Zorraquino, V., Valle, J., *et al.* (2009) Genetic reductionist approach for dissecting individual roles of GGDEF proteins within the c-di-GMP signaling network in *Salmonella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (19), pp. 7997-8002.
- Somers, E., Vanderleyden, J. and Srinivasan M. (2004) Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*, 30 (4), pp. 205-240.

Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N. and Hengge, R. (2009) Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155 (4), pp. 1318-1331.

Sørensen, J., Jensen, L.E. and Nybroe, O. (2001) Soil and rhizosphere as habitats for *Pseudomonas* inoculants: New knowledge on distribution, activity and physiological state derived from micro-scale and single-cell studies. *Plant and Soil*, 232 (1-2), pp. 97-108.

Sørensen, S.J., Bailey, M., Hansen, L.H., Kroer, N. and Wuertz, S. (2005) Studying plasmid horizontal transfer in situ: A critical review. *Nature Reviews Microbiology*, 3 (9), pp. 700-710.

Spiers, A.J., Kahn, S.G., Bohannon, J., Travisano, M. and Rainey, P.B. (2002) Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. I. Genetic and phenotypic bases of wrinkly spreader fitness. *Genetics*, 161 (1), pp. 33-46.

Spiers, A.J., Bohannon, J., Gehrig, S.M. and Rainey, P.B. (2003) Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Molecular Microbiology*, 50 (1), pp. 15-27.

Stanley, N.R. and Lazazzera, B.A. (2004) Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 52 (4), pp. 917-924.

Stewart, P.S. and Franklin, M.J. (2008) Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6 (3), pp. 199-210.

Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Ihring, A., Schmid, M., Gantner, S., *et al.* (2001) Visualization of N-Acylhomoserine Lactone-Mediated Cell-Cell Communication between Bacteria Colonizing the Tomato Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (12), pp. 5761-5770.

Stohl, E.A. and Seifert, H.S. (2006) *Neisseria gonorrhoeae* DNA recombination and repair enzymes protect against oxidative damage caused by hydrogen peroxide (2006) *Journal of Bacteriology*, 188 (21), pp. 7645-7651.

Sudarsan, N., Lee, E.R., Weinberg, Z., Moy, R.H., Kim, J.N., Link, K.H., Breaker, R.R. (2008) Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic Di-GMP. *Science*, 321 (5887), pp. 411-413.

Taiz, L and Zeiger, E. (2007) Fisiología Vegetal. Vol 2. Universitat Jaume I, pp. 663-667.

Tal, R., Wong, H.C., Calhoon, R., Gelfand, D., Fear, A.L., Volman, G., *et al.* (1998) Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes. *Journal of Bacteriology*, 180, pp. 4416-4425.

Tamayo, R., Tischler, A.D. and Camilli, A. (2005) The EAL domain protein VieA is a cyclic diguanylate phosphodiesterase. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (39), pp. 33324-33330.

Tamayo, R., Pratt, J.T. and Camilli, A. (2007) Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 61, pp. 131-148.

Tarutina, M., Ryjenkov, D.A. and Gomelsky, M. (2006) An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (46), pp. 34751-34758.

Teplitski, M., Robinson, J.B. and Bauer, W.D. (2000) Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13 (6), pp. 637-648.

Teplitski, M., Chen, H., Rajamani, S., Gao, M., Merighi, M., Sayre, R.T., et al. (2004) *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria. *Plant Physiology*, 134 (1), pp. 137-146.

Terashima, H., Kojima, S. and Homma, M. (2008) Flagellar motility in bacteria. Structure and function of flagellar motor. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 270 (C), pp. 39-85.

Termine, E. and Michel, G.P.F. (2009) Transcriptome and secretome analyses of the adaptive response of *Pseudomonas aeruginosa* to suboptimal growth temperature. *International Microbiology* 12 (1), pp. 7-12.

Teughels, W., Van Assche, N., Sliepen, I. and Quirynen, M. (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clinical Oral Implants Research*, 17 (SUPPL. 2), pp. 68-81.

Thomas, X., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Afonso, C., Blond, A., Birlirakis, N., et al. (2004) Siderophore peptide, a new type of post-translationally modified antibacterial peptide with potent activity. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (27), pp. 28233-28242.

Thomashow, L.S. and Weller, D.M. (1988) Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*, 170 (8), pp. 3499-3508.

Timmusk, S., Grantcharova, N. and Wagner, E.G.H. (2005) *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms. *Applied Environmental Microbiology*, 71, pp. 7292-7300.

Tischler, A.D. and Camilli, A. (2004) Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 53 (3), pp. 857-869.

Tischler, A.D. and Camilli, A. (2005) Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression. *Infection and Immunity*, 73 (9), pp. 5873-5882.

Tjamos, S.E., Flemetakis, E., Paplomatas, E.J. and Katinakis, P. (2005) Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18 (6), pp. 555-561.

Toledo-Arana, A., Valle, J., Solano, C., Arrizubieta, M.J., Cucarella, C., Lamata, M., et al. (2001) The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in *Enterococcus*

faecalis Biofilm Formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (10), pp. 4538-4545.

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 (22), pp. 6308-6321.

Ton, J., Van Pelt, J.A., Van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. (2002) Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15 (1), pp. 27-34.

Torres, A.G., Jeter, C., Langley, W. and Matthyse, A.G. (2005) Differential binding of *Escherichia coli* O157:H7 to alfalfa, human epithelial cells, and plastic is mediated by a variety of surface structures. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (12), pp. 8008-8015.

Toutain, C.M., Zegans, M.E. and O'Toole G.A. (2005) Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 187 (2), pp. 771-777.

Tschowri, N., Busse, S. and Hengge, R. (2009) The BLUF-EAL protein YcgF acts as a direct anti-repressor in a blue-light response of *Escherichia coli*. *Genes and Development*, 23 (4), pp. 522-534.

Turnbull, G.A., Morgan, J.A., Whipps, J.M. and Saunders, J.R. (2001) The role of motility in the *in vitro* attachment of *Pseudomonas putida* PaW8 to wheat roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 35 (1), pp. 57-65.

Ugidos, A., Morales, G., Rial, E., Williams, H.D. and Rojo, F. (2008) The coordinate regulation of multiple terminal oxidases by the *Pseudomonas putida* ANR global regulator. *Environmental Microbiology*, 10(7), pp. 1690-702.

Ulrich, L.E. and Zhulin, I.B. (2007) MiST: A microbial signal transduction database. *Nucleic Acids Research*, 35 (SUPPL. 1) pp. D386-D390.

Uren, N.C. (2007) Types, amounts, and possible functions of compounds released into rhizosphere by soil-grown plants. In Pinton, R., Varanini, Z. and Nannipieri, P. (eds.) *The Rhizosphere: Biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. CRC Press, New York, pp. 1-21.

Van Den Broek, D., Bloemberg, G.V. and Lugtenberg, B. (2005) The role of phenotypic variation in rhizosphere *Pseudomonas* bacteria. *Environmental Microbiology*, 7 (11), pp. 1686-1697.

Van Diepeningen, A.D., De Vos, O.J., Zelenev, V.V., Semenov, A.M. and Van Bruggen, A.H.C. (2005) DGGE fragments oscillate with or counter to fluctuations in cultivable bacteria along wheat roots. *Microbial Ecology*, 50 (4), pp. 506-517.

van Hulten, M., Pelsler, M., Van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. and Ton, J. (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (14), pp. 5602-5607.

van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. (2005) Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Z.A. Siddiqui (ed.), Springer, Dordrecht, pp. 39-66.

- van Loon, L.C., Rep, M. and Pieterse, C.M.J. (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, pp. 135-162.
- van Loon, L.C. (2007) Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal of Plant Pathology*, 119 (3), pp. 243-254.
- van Overbeek, L.S. and van Elsas, J.D. (1995) Root exudate-induced promoter activity in *Pseudomonas fluorescens* mutants in the wheat rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3), pp. 890-898.
- van Peer, R, Niemann, G.J. and Schippers, B. (1991) Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology* 81, pp. 728-734.
- Van Wees, S.C.M., Pieterse, C.M.J., Trijssenaar, A., Van't Westende, Y.A.M., Hartog, F. and van Loon, L.C. (1997) Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10, pp. 716-724.
- Van Wees, S.C.M., De Swart, E.A.M., Van Pelt, J.A., van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J. (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (15), pp. 8711-8716.
- Vancura, V. (1964) Root exudates of plants. I. Analysis of root exudates of barley and wheat in their initial phases of growth. *Plant Soil*, 21, pp. 231-248.
- Vancura, V. (1980) Fluorescent pseudomonads in the rhizosphere of plants and their relation to root exudates. *Folia Microbiologica*, 25 (2), pp. 168-173.
- Venturi, V. (2003) Control of *rpoS* transcription in *Escherichia coli* and *Pseudomonas*: Why so different? *Molecular Microbiology* 49, pp. 1-9.
- Verhagen, B. W. M., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H. S., Van Loon, L. C. and Pieterse, C. M. J. (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17, pp. 895-908.
- Vesper, S. J. (1987) Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. *Applied Environmental Microbiology*, 53, pp. 1397-1405.
- Vessey, J.K. (2003) Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255 (2), pp. 571-586.
- Vetterlein, D. and Jahn, R. (2004) Gradients in soil solution composition between bulk soil and rhizosphere - In situ measurement with changing soil water content. *Plant and Soil*, 258 (1-2), pp. 307-317.
- Vílchez, S., Molina, L., Ramos, C. and Ramos, J.L. (2000) Proline catabolism by *Pseudomonas putida*: Cloning, characterization, and expression of the *put* genes in the presence of root exudates. *Journal of Bacteriology*, 182 (1), pp. 91-99.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. and Défago, G. (1989) Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO Journal*, 8, pp. 351-358.

- Vlot A.C., Klessig, D.F. and Park, S.W.** (2008) Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, 11 (4), pp. 436-442.
- Wagner, R.** (1994) The regulation of ribosomal RNA synthesis and bacterial cell growth. *Archives of Microbiology*, 161 (2), pp. 100-109.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Halligan, K.M., Stermitz, F.R. and Vivanco, J.M.** (2003) Metabolic profiling of root exudates of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (9), pp. 2548-2554.
- Walker, T.S., Bais, H.P., Deziel, E., Schweizer, H.P., Rahme, L.G., Fall, R. and Vivanco, J.M.** (2004) *Pseudomonas aeruginosa*-Plant Root Interactions. Pathogenicity, Biofilm Formation, and Root Exudation. *Plant Physiology*, 134 (1), pp. 320-331.
- 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 (1), pp. 169-187.
- Waters, C.M., Lu, W., Rabinowitz, J.D. and Bassler, B.L.** (2008) Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae* through modulation of cyclic Di-GMP levels and repression of *vpsT*. *Journal of Bacteriology*, 190 (7), pp. 2527-2536.
- Watt, M., Hugenholtz, P., White, R. and Vinall, K.** (2006) Numbers and locations of native bacteria on field-grown wheat roots quantified by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Environmental Microbiology*, 8, pp. 871-84.
- Webb, J.S., Givskov, M. and Kjelleberg, S.** (2003) Bacterial biofilms: Prokaryotic adventures in multicellularity. *Current Opinion in Microbiology*, 6 (6), pp. 578-585.
- Weber, H., Pesavento, C., Possling, A., Tischendorf, G. and Hengge, R.** (2006) Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the σ^S network of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 62 (4), pp. 1014-1034.
- Wei, G., Kloepper, J.W. and Tuzun, S.** (1991) Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, 81, pp. 1508-1512
- Wei, H.L. and Zhang, L.Q.** (2006) Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 89 (2), pp. 267-280.
- Whipps, J.M.** (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, 52 (SPEC. ISS. MAR.), pp. 487-511.
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C. and Mattick, J. S.** (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, 295, pp. 1487.
- Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C. and Cámara, M.** (2007) Look who's talking: Communication and quorum sensing in the bacterial world. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362 (1483), pp. 1119-1134.
- Wolfe, A.J.** (2005) The acetate switch. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 69 (1), pp. 12-50.

- Yamagata, A., Kakuta, Y., Masui, R. and Fukuyama, K.** (2002) The crystal structure of exonuclease RecJ bound to Mn²⁺ ion suggests how its characteristic motifs are involved in exonuclease activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (9), pp. 5908-5912.
- Yang, C.H. and Crowley, D.E.** (2000) Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (1), pp. 345-351.
- Yang, C.H., Crowley, D.E. and Menge, J.A.** (2001) 16S rDNA fingerprinting of rhizosphere bacterial communities associated with healthy and *Phytophthora* infected avocado roots. *FEMS Microbiology Ecology*, 35 (2), pp. 129-136.
- Yao, J. and Allen, C.** (2006) Chemotaxis is required for virulence and competitive fitness of the bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 188 (10), pp. 3697-3708.
- Yaryura, P.M., Leon, M., Correa, O.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L. and García, A.F.** (2008) Assessment of the role of chemotaxis and biofilm formation as requirements for colonization of roots and seeds of soybean plants by *Bacillus amyloliquefaciens* BNM339. *Current Microbiology*, 56 (6), pp. 625-632.
- Yildiz, F.H. and Schoolnik, G.K.** (1999) *Vibrio cholerae* O1 El Tor: Identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (7), pp. 4028-4033.
- Youssef, R.A. and Chino, M.** (1991) Movement of metals from soil to plant roots. *Water, Air, and Soil Pollution*, 57-58, pp. 249-258.
- Yousef-Coronado, F., Travieso, M.L. and Espinosa-Urgel, M.** (2008) Different, overlapping mechanisms for colonization of abiotic and plant surfaces by *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiology Letters* 288 (1), pp. 118-124.
- Zhang, W.H., Ryan, P.R. and Tyerman S.D.** (2001) Malate-permeable channels and cation channels activated by aluminum in the apical cells of wheat roots. *Plant Physiology*, 125 (3), pp. 1459-1472.
- Zhang, X.X., George, A., Bailey, M.J. and Rainey, P.B.** (2006) The histidine utilization (*hut*) genes of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 are active on plant surfaces, but are not required for competitive colonization of sugar beet seedlings. *Microbiology*, 152(6), pp. 1867-75.
- Zhang, X.X. and Rainey, P.B.** (2007) The role of a P1-type ATPase from *Pseudomonas fluorescens* SBW25 in copper homeostasis and plant colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20 (5), pp. 581-588.
- Zheng, X.Y. and Sinclair, J.B.** (1996) Chemotactic response of *Bacillus megaterium* strain B153-2-2 to soybean root and seed exudates. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 48 (1), pp. 21-35.
- Zhu, G.Y., Dobbelaere, S. and Vanderleyden, J.** (2002) Use of green fluorescent protein to visualize rice root colonization by *Azospirillum irakense* and *A. brasilense*. *Functional Plant Biology*, 29 (11), pp. 1279-1285.
- Zhu, J. and Mekalanos, J.J.** (2003) Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Developmental Cell*, 5 (4), pp. 647-656.

Zhulin, I.B., Tretyakova, S.E. and Ignatov V.V. (1988) Chemotaxis of *Azospirillum brasilense* towards compounds typical of plant root exudates. *Folia Microbiologica*, 33 (4), pp. 277-280.

Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro. L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., and Boller, T. (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, 428, pp. 764-767.