



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

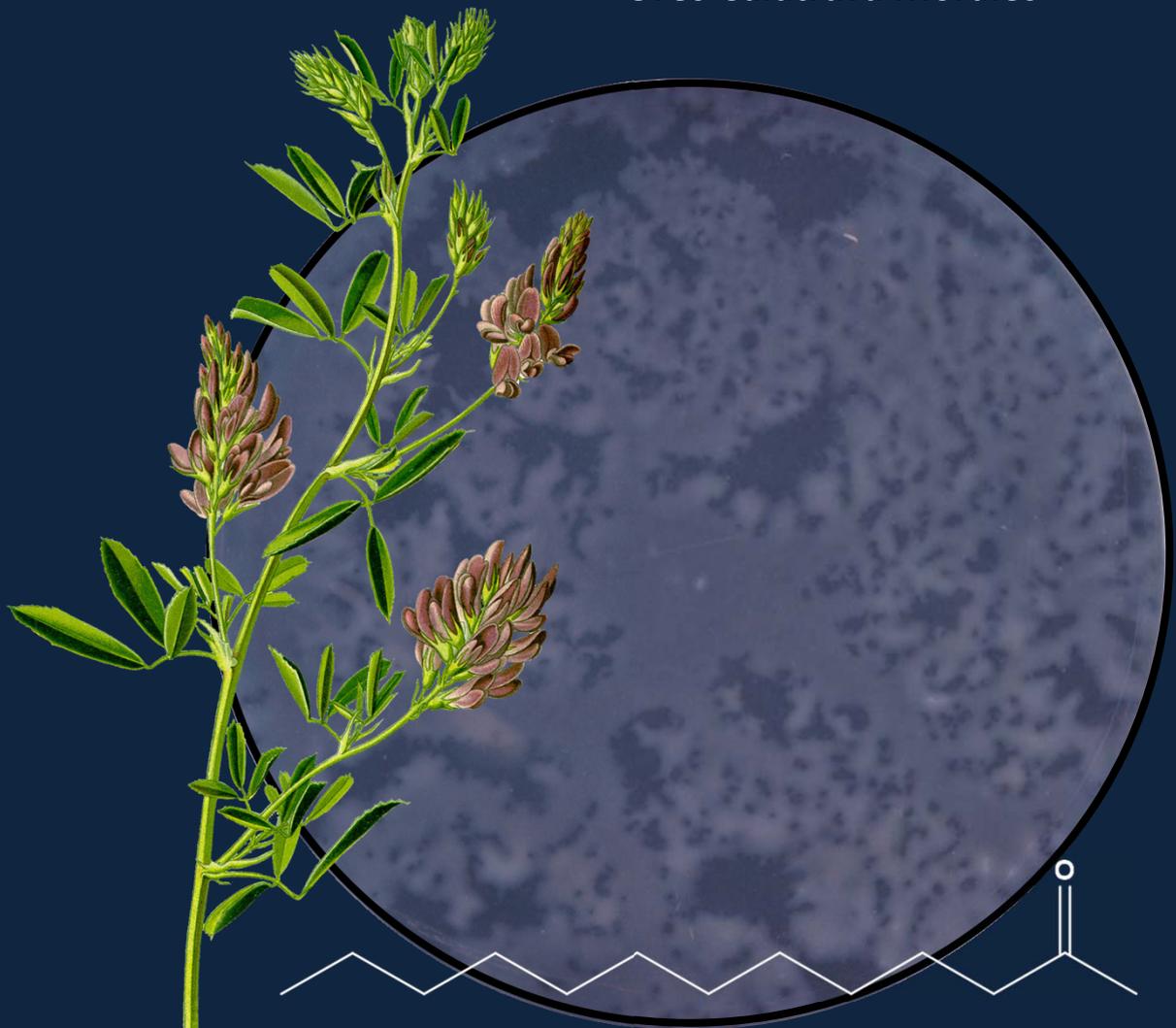


CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

2-Tridecanona como molécula señal en *Sinorhizobium meliloti*: impacto en la nodulación de alfalfa e identificación de las bases moleculares implicadas

M^a Nieves Calatrava Morales



Posgrado oficial en Biología Fundamental y de Sistemas

Tesis Doctoral, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autora: María de las Nieves Calatrava Morales
ISBN: 978-84-9163-294-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/47395>



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos
Estación Experimental del Zaidín, CSIC-Granada



2-Tridecanona como molécula señal en *Sinorhizobium meliloti*: impacto en la nodulación de alfalfa e identificación de bases moleculares implicadas

María Nieves Calatrava Morales

Postgrado oficial en Biología Fundamental y de Sistemas

Tesis Doctoral 2017

Agradezco a José Carlos Gómez su colaboración en la elaboración de la cubierta de esta Tesis.

La imagen principal de la cubierta muestra una ilustración de la planta *Medicago sativa* (alfalfa) realizada por el botánico alemán Otto Wilhelm Thomé (1840-1925), una fotografía de una colonia *swarmer* de *Sinorhizobium meliloti* GR4, y una figura con la estructura química de la 2-Tridecanona.

Las tres fotografías de la contracubierta corresponden a nódulos de raíz de alfalfa, una micrografía electrónica de transmisión de una célula de *S. meliloti* GR4 en la que se pueden observar los flagelos, y una imagen de una biopelícula formada por dicha bacteria y obtenida mediante microscopía láser confocal.

Todas las fotografías han sido tomadas durante la realización de este trabajo.

**2-Tridecanona como molécula señal en *Sinorhizobium meliloti*:
impacto en la nodulación de alfalfa e identificación de las
bases moleculares implicadas**

Memoria de Tesis presentada por la Licenciada en Biotecnología

María Nieves Calatrava Morales

Fdo. M^a Nieves Calatrava Morales

VºBº

De la Directora de Tesis

Fdo.: María José Soto Misffut

Doctora en Ciencias Biológicas

Científico Titular del CSIC

Granada, 2017

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

Informa:

Que el trabajo de investigación titulado “2-Tridecanona como molécula señal en *Sinorhizobium meliloti*: impacto en la nodulación de alfalfa e identificación de las bases moleculares implicadas”, realizado por la licenciada María Nieves Calatrava Morales bajo mi dirección, se considera ya finalizado y puede ser presentado para su exposición y defensa como Tesis Doctoral de la Universidad en Granada.

Granada, mayo de 2017

Fdo.: Dra. María José Soto Misffut

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Grupo de Genética de Infecciones Fitobacterianas, perteneciente al Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (Granada). Ha sido financiada gracias a una beca para estudios de doctorado de la ONCE (España) y a una ayuda para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (España).

Parte de los resultados de este trabajo han sido presentados en los siguientes congresos y artículos.

Congresos:

Nogales, J., Calatrava-Morales, N., Ameztoy, K., van Steenberg, B. & Soto, M.J. (2013) Funciones controladas por el sistema NtrY/NtrX identificadas durante la caracterización de la movilidad en superficie de *Sinorhizobium meliloti*. *V Reunión del Grupo Especializado en Microbiología de Plantas de la Sociedad Española de Microbiología*. Girona (España).

Calatrava-Morales, N., Nogales, J., Ameztoy, K., van Steenberg, B. & Soto, M.J. (2013) Control de movilidad y producción de EPS I en *Sinorhizobium meliloti*: nuevas funciones asignadas al sistema NtrY/X. *II Iberoamerican Conference on Beneficial Plant-Microorganism-Environment Interactions (IBEMPA)*. Sevilla (España).

Calatrava-Morales, N., Nogales, J., Ameztoy, K., van Steenberg, B. & Soto, M.J. (2014) The NtrY/NtrX system of *Sinorhizobium meliloti* GR4 regulates motility, EPS I production, and nitrogen metabolism but is dispensable for symbiotic nitrogen fixation. *11th European Nitrogen Fixation Conference (ENFC)*. Adeje (España).

López-Lara, I.M., Nogales, J., Pech-Canul, A., Bernabéu-Roda, L., Calatrava-Morales, N., Olivares, J., Álvarez, L., Geiger, O., & Soto, M.J. (2014) Un insecticida natural interfiere con comportamientos bacterianos clave en procesos infectivos. *XXXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*. Granada (España).

Bernabéu-Roda, L., Calatrava-Morales, N. & Soto, M.J. (2015) Señales y genes bacterianos implicados en movilidad en superficie de *Sinorhizobium meliloti*: Papel en el establecimiento de simbiosis. *VI Reunión del Grupo Especializado en Microbiología de Plantas de la Sociedad Española de Microbiología*. Miraflores de la Sierra (España).

Calatrava-Morales, N., Nogales, J., Ameztoy, K., van Steenberg, B. & Soto, M.J. (2015) Papel regulador del sistema NtrY/X de *Sinorhizobium meliloti* GR4. XXV Congreso Nacional de Microbiología. La Rioja (España).

Artículos:

Bernabéu-Roda L., Calatrava-Morales N., Cuéllar V. & Soto M.J. (2015) Characterization of surface motility in *Sinorhizobium meliloti*: regulation and role in symbiosis. *Symbiosis* **67**, 79-90.

Calatrava-Morales, N., Nogales, J., Ameztoy, K., van Steenberg, B. & Soto, M.J. (2017) The NtrY/NtrX system of *Sinorhizobium meliloti* GR4 regulates motility, EPS I production and nitrogen metabolism but is dispensable for symbiotic nitrogen fixation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. doi: 10.1094/MPMI-01-17-0021-R.

López-Lara, I.M., Nogales, J., Pech-Canul, A., Calatrava-Morales, N., Bernabéu-Roda, L.M., Durán, P., Cuéllar, V., Olivares, J., Álvarez, L., Palenzuela-Bretónes, D., Romero, M., Heeb, S., Cámara, M., Geiger, O. & Soto, M.J. 2-Tridecanone impacts surface-associated bacterial behaviours and hinders plant-bacteria interactions. Submitted to *The ISME Journal*.

Otras publicaciones:

Soto M.J., Calatrava-Morales N. & López-Lara I.M. (2017) Functional roles of non-membrane lipids in bacterial signaling. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (ed. by Geiger O), pp. 1-17. Springer.

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

Granada, mayo de 2017

María José Soto Misffut
Directora de tesis

María Nieves Calatrava Morales
Doctoranda

Fdo.:

Fdo.:

**A los hermanos Calatrava Albújar:
Manuel, Bibiana, Faustina, Carmen y Emilio**

Reconocimientos

A continuación quisiera mostrar mi reconocimiento a las personas e instituciones que de alguna u otra forma han contribuido a la realización del trabajo presentado en esta Memoria de Tesis.

A mi directora, la Dra. María José Soto, por abrirme las puertas de su laboratorio. Por su paciencia y su gran labor como guía durante estos años, y por enseñarme a reflexionar de manera crítica.

A los Profesores Miguel Cámara (Universidad de Nottingham) y Anke Becker (Universidad de Marburg), por permitirme realizar estancias en sus laboratorios, y ayudar así en mi formación predoctoral y en la obtención de resultados.

A los Dres. Diana Palenzuela y Matthew McIntosh, por su inestimable ayuda y guía en el apasionante mundo de las biopelículas y el *quorum sensing*.

A las Dras. Joaquina Nogales y Lydia Bernabéu, por su ayuda en la obtención e interpretación de algunos de los resultados recogidos en esta Tesis.

A Virginia Cuéllar, por la magnífica labor técnica (y a veces científica) prestada a lo largo de este tiempo.

A Kinia Ameztoy y Natalia García, por colaborar en la caracterización de algunas de las cepas bacterianas estudiadas en esta Tesis.

A los servicios de Secuenciación, Microscopía e Instrumentación de la Estación Experimental del Zaidín, y a las unidades de Microscopía Electrónica e Información Genética de la Universidad de Granada, cuya labor ha sido fundamental para la obtención de algunos de los resultados de mi Tesis.

Al Dr. Pieter van Dillewijn, por su ayuda con el inglés y por sus ánimos en la ardua tarea que a veces supone publicar un *paper*.

A las Dras. M^a Jesús Delgado y M^a Jesús Torres, por su colaboración con los experimentos de microaerobiosis.

Al personal del Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, por su buena disposición y amabilidad ante cualquier duda que se haya presentado. En particular, a los miembros de los grupos de Interacciones Planta-Bacteria y Biofertilización y Biorremediación por Hongos Rizosféricos, con quienes he compartido espacio, muchas horas y buenos consejos a lo largo de este periodo.

Al personal de administración, mantenimiento, limpieza, seguridad y cafetería de la EEZ, por su disponibilidad y profesionalidad ante cualquier cosa que haya necesitado. Particularmente quiero agradecer la labor de Carmen Lorente y Pedro Palomares, por su eficacia a la hora de resolver cualquier duda o problema. Y también a Pedro, Nico y Rúper por su amabilidad e interés constante.

Al Departamento de Fisiología Vegetal de la UGR, en especial al Profesor Juan Manuel Ruíz, por permitirme y facilitarme hacer las prácticas de docencia, una actividad que he disfrutado muchísimo.

Al Ministerio de Educación por concederme la ayuda FPU que me ha permitido realizar esta Tesis Doctoral. A la ONCE, no sólo por financiar parte de mi periodo de Tesis, sino por la contribución que han hecho a mi formación y por la magnífica labor que hacen con sus afiliados. En particular quiero agradecer a las delegaciones de Extremadura, Salamanca y Granada, en donde he podido conocer a grandes profesionales y buenísimas personas.

Agradecimientos

Sin terminar de creerlo todavía, ha llegado el momento de ir poniendo punto final a la que ha sido hasta ahora la mejor etapa de mi vida. Casi seis años dan para mucho, así que espero ser capaz de ir desenrollando en estos párrafos la maraña de recuerdos, sentimientos y emociones que se agolpan ahora mismo en mi cabeza. A todas las personas que me han acompañado a lo largo de esta aventura, estén nombradas aquí o no, sinceramente, GRACIAS.

Gracias a María José, por enseñarme a hacer ciencia, a vivirla y a disfrutarla; pero sobre todo por enseñarme a defenderla. Son muchas las lecciones que me llevo de tu parte, más allá de lo laboral, y sé que haga lo que haga en el futuro podré aplicarlas en el día a día. Tras todo lo vivido y aprendido bajo tu dirección, hoy puedo afirmar que no sólo no me equivoqué, sino que acerté de pleno.

Gracias a tod@s l@s que han formado parte del *swarming team*.

Quiero tener un especial recuerdo para Kinia, Paloma y Natalia, con quienes lo pasé muy bien “cacharreando” y que con su trabajo han contribuido a enriquecer esta Tesis.

Por supuesto no puedo olvidarme de los “miarmas”, también conocidos como Edu, Manu y Juan Carlos. Gracias por los buenos momentos vividos.

A Carol, con quien pasé mis primeras tardes en el laboratorio. Mientras tú escribías tu Tesis yo trataba de empaparme de los artículos y de tus consejos de veterana.

A Quina, de cuya mano comencé a dar mis primeros pasos en el mundo del *swarming* y que me brindó la oportunidad de empezar a contribuir en la obtención de resultados. Gracias por tu paciencia y por haberme enseñado tantas cosas.

Y cómo no, a quienes han sido piezas fundamentales en el engranaje de esta máquina. A Virgi y a Lydia. Me hubiera gustado daros una dedicatoria individualizada, pero lo que pueda decir de una es perfectamente aplicable a la otra (bueno, salvo que Virgi es la Messi del laboratorio, pero eso no es una dedicatoria sino una verdad científica). Gracias chicas por vuestra ayuda, por vuestros ánimos y consejos, por nuestras risas. De los buenos, habéis hecho momentos geniales, y de los malos, simplemente regularcillos. De estos años me llevo el haber trabajado codo con codo con dos excelentes profesionales y mejores personas. Y porque pase lo que pase, nosotras a lo nuestro. *Just keep swarming*.

A mis compis de fatiga, desayunitos y *tuppers*.

A Vivi y Harold, a quienes, a pesar del tiempo y la distancia, sigo recordando con mucho cariño. A Pao y Chema, por alegrarse con mis pequeñas conquistas y animarme en las dificultades. A Lorena, por ser tan buena persona y tan buena compañera; sé que contigo siempre tendré una mano amiga en la “costa tropicué”. A mi “familia granaína”, por haber sido más que compañeros de trabajo. A Dani, por los buenos consejos, y por todo lo que he aprendido en cada conversación. A Rocío, por tu forma de ser, por tus abrazitos, y por enseñarme que se puede ser todo lo que una quiera en esta vida. A David, por tu gran corazón y tu infinita curiosidad, no pierdas nunca ninguna de las dos cosas. A Marta, con quien he corrido en paralelo, saltando obstáculos y esprintando, en esta carrera “zaidinera” que arrancó en Salamanca; por ser tan buena gente y por mostrarme que con esfuerzo e interés todo se consigue.

A las personas que he tenido la suerte de encontrarme por el mundo gracias a la ciencia.

A quienes me acompañaron durante mi estancia en el laboratorio del Dr. Miguel Cámara en Nottingham. En especial a Diana, Christian, Edu, Manu, Manuco, Mike, Vanina, Óscar, Félix, Iván, y el resto de predocs.

Al equipo de la Dra. Anke Becker. En especial a Matthew, Doreen, Liza, Bettina, Javi, Simon y Stefan; por su amabilidad, su ayuda y su acogida. A Vicente y Julieta, la palabra que me viene a la mente cuando me acuerdo de vosotros es oasis; me alegro muchísimo de haberos conocido y de haber compartido tan buenos momentos en ese rincón de cuento llamado Marburg.

A los Dres. Tino Krell y Abdelali Daddaoua, y a Jesús de la Torre, por guiarme en mi pequeña incursión en el mundo de las proteínas y los análisis por ITC. Gracias por los consejos y por lo que aprendí de mi mini-estancia en la Casa Blanca.

A Ruth, por ser una amiga con mayúsculas. Tengo muchísima suerte de saber que puedo contar contigo, da igual el tiempo que pase. Y porque estoy convencida de que tarde o temprano acabaremos gritando “¡Lo conseguimos!” desde la Estatua de la Libertad.

A Julia, por esa amistad nuestra tan peculiar, tan del Guadiana, que la veas o no sabes que está ahí. Espero que así siga siendo por mucho tiempo.

A mis “vilanos talayeros”. Dicen que los amigos son la familia que se elige. Nuestras circunstancias no nos permitieron elegir y tuvimos que aguantarnos. Pero, ¿sabéis qué? Que si volviera hacia atrás, yo os elegiría. Por todo lo que hemos compartido (y lo que nos queda), porque en la mayoría de recuerdos en los que me veo riendo a carcajadas y olvidándome del mundo estáis vosotros, y porque juntos hemos aprendido que la edad del pavo es más divertida después de los dieciocho.

A mi familia.

A mis tíos y primos, porque una siempre va por la vida más tranquila sabiendo que tiene sólidos pilares en los que apoyarse. A mi otra familia, puede que no de sangre, pero sí de espíritu, a los Hernández García.

A mis abuelos Carmen y Luis, por transmitirme sus valores y por ser para mí un referente de lucha y bondad.

A los verdaderos responsables de que hoy esté escribiendo estas líneas. A Nieves y Julián, mis padres, que sin verme nacer me regalaron la vida; no hay Tesis suficientes para agradecer todo lo que os debo. A Cristina, mi hermana pequeña, por aceptar ser de vez en cuando mi hermana mayor, eres la mejor. A los tres, gracias por ser el claro ejemplo de que al final la vida te compensa por aquello que te quita, os quiero mucho.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
AcN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN complementario
AHK	Alfa-hidroxiketona
AHL	Acil-homoserina lactona
AN	Agar Noble
Ap	Ampicilina
AP	Agar Pronadisa
ANOVA	Análisis de la varianza de un factor
ARN	Ácido ribonucleico
Bm	Medio de Bromfield
Cf	Calcoflúor
C14-HL	N-tetradecanoil-L-homoserina lactona
Cm	Cloranfenicol
CV	Cristal violeta
2-DC	2-Decanona
2-DDC	2-Dodecanona
di-GMPc	Diguanilato cíclico
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
dpi	Días post-inoculación/post-inducción
DSF	<i>Difussible Signal Factor</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPS	Exopolisacárido
<i>et al.</i>	Y colaboradores
EtOH	Etanol
F	Fluorescencia
FBN	Fijación biológica del nitrógeno
FN	Factor Nod
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
Gm	Gentamicina
gr	Gramo
h	Horas
2-Hp	2-Heptanona
2-HpDC	2-Heptadecanona

hpi	Horas post-inoculación/post-inducción
2-HxDC	2-Hexadecanona
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
kb	Kilobase
Km	Kanamicina
l	Litro
L	Luminiscencia
m/z	Relación masa/carga
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
MK	Metilcetona
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MM	Medio Mínimo
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
nM	Nanomolar
2-Nn	2-Nonanona
3O-C8-HL	N-3-oxo-octanoil-L-homoserina lactona
3O-C14-HL	N-3-oxo-tetradecanoil-L-homoserina lactona
3O-C16:1-HL	N-3-oxo-hexadec-11(Z)-enoil-L-homoserina lactona
2-ODC	2-Octadecanona
ONPG	O-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
p/v	Peso/Volumen
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
2-PDC	2-Pentadecanona
PFR	Peso fresco de raíz
pmol	Picomol
ppGpp	Guanosina tetrafosfato
QS	<i>Quorum sensing</i>
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
Sm	Sulfato de estreptomina
SPME	Microextracción en fase sólida
TBE	Tampón tris-borato-EDTA
Tc	Tetraciclina
TCS	Sistema de dos componentes

2-TDC	2-Tridecanona
3-TDC	3-Tridecanona
4-TDC	4-Tridecanona
7-TDC	7-Tridecanona
TE	Tampón Tris-EDTA
TEM	Microscopio electrónico de transmisión
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSS3	Sistema de secreción Tipo III
TY	Medio de triptona y extracto de levadura
2-UDC	2-Undecanona
UFC	Unidades formadoras de colonia
V	Voltios
X-gal	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -galactósido
X-gluc	Ácido 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-glucorónido
°C	Grado centígrado
μm	Micrómetro
μM	Micromolar
μmol	Micromol

Summary

Rhizobium is a generic term used to refer to a broad group of soil-dwelling bacteria that can establish beneficial symbiotic associations with legume plants in which they induce the formation of nitrogen-fixing root nodules. This mutualistic symbiosis has received much attention from the scientific community, not only due to its agronomic and ecological importance, but also as a model to study plant-bacteria interactions. Genes and regulatory mechanisms controlling nodulation and nitrogen fixation have been studied in detail. However, the knowledge about early stages of the interaction comprising root adsorption and colonization is scarce. Swarming motility and biofilm formation are surface-associated traits that enable many bacteria to colonize and infect their eukaryotic hosts. Swarming is a flagellum-driven bacterial group motility characterized by a rapid and coordinated population migration across solid surfaces. It involves a differentiation process in which notable changes in gene expression occur. Biofilms are defined as sessile multicellular communities firmly attached to a surface and in which cells are protected against adverse environmental conditions. These opposing behaviours, which have been profusely studied in pathogenic bacteria, are closely linked, and the same cell surface-associated structures and regulatory systems have been involved in both processes. Moreover, they are known to confer resistance to antimicrobial agents and contribute to the virulence of pathogens (Kearns 2010; Verstraeten *et al.* 2008). Swarming and biofilm formation also occur in beneficial bacteria such as rhizobia. However, the genetic determinants as well as the environmental cues controlling these two phenotypes in this group of bacteria are largely unknown.

The alfalfa symbiont *Sinorhizobium meliloti* is a flagellated α -proteobacterium that is able to move over the surface of semisolid media and to develop biofilms on both biotic and abiotic substrates (Bernabéu-Roda *et al.* 2015; Amaya-Gómez *et al.* 2015; Nogales *et al.* 2012; Fujishige *et al.* 2006a; Soto *et al.* 2002). Recent investigations performed in Dr. Soto's lab has led to the identification of control mechanisms that inversely regulate swarming and biofilm formation in *S. meliloti* and that contribute to efficient plant root colonization (Amaya-Gómez *et al.* 2015). One of these mechanisms involves the participation of the acyl-CoA ligase FadD, which is responsible for the conversion of long-chain fatty acids into acyl-CoAs which can enter β -oxidation. In *S. meliloti*, *fadD* loss-of-function promotes surface translocation, obstructs normal biofilm development, and impairs the nodulation and colonization efficiency of alfalfa roots (Amaya-Gómez *et al.* 2015; Soto *et al.* 2002). Biochemical characterization of a *fadD*

mutant of the wild-type *S. meliloti* strain GR4 revealed the accumulation of several lipid compounds, such as free fatty acids, the aldehyde dodecanal, and the methylketone (MK) 2-Tridecanone, which were present in spent culture supernatants of the mutant strain but not of the wild type. Swarming motility assays performed with wild-type strains of *S. meliloti* showed that, among these compounds, only the methylketone 2-Tridecanone (2-TDC) was able to stimulate this type of translocation when added to the medium, an effect that was dose-dependent. Additional analyses have shown that this MK, without affecting the growth of *S. meliloti*, also induces motility in a dose-dependent manner when is applied as a volatile. Moreover, this stimulation is surface-specific and affects flagella-less mutant strains, indicating that 2-TDC promotes swarming and a flagella-independent movement.

2-TDC is a volatile MK known as a natural insecticide that is produced in large amounts by wild tomato plants (*Solanum habrochaites* ssp. *glabratum*), which makes these plants naturally resistant to a wide spectrum of arthropod pests (Williams *et al.* 1980). Production of 2-TDC has been reported for other plants (Kirillov *et al.* 2017; Ghribi *et al.* 2016; Antonious, 2013), animals (Soini *et al.* 2007; Wood *et al.* 1995), and a wide diversity of bacterial isolates (Lemfack *et al.* 2014). However, the effects of this MK on bacterial behaviours have not been hitherto described. Studying how 2-TDC controls surface motility in a model plant-interacting bacterium at the molecular level will undoubtedly contribute to identifying new genetic determinants and regulatory mechanisms important for the interaction between bacteria and eukaryotic hosts. This knowledge could be used to develop new approaches for disease control, as well as, to design more efficient beneficial microorganisms.

The **main objective** of this Doctoral Thesis has been to identify new molecular mechanisms involved in the early stages of the *Rhizobium*-legume interaction, by studying the effects produced by 2-TDC on both free-living and symbiotic lifestyles of the model bacterium *S. meliloti*, as well as determining some of the molecular bases responsible for the mode of action of this compound.

As part of the first specific objective of this study, we have evaluated how 2-TDC impacts biofilm formation and the symbiotic capacity of *S. meliloti*. The results obtained confirm that the accumulation of the MK partly accounts for the phenotypes caused by the *fadD* mutation. 2-TDC reduced the bacterial ability to form surface-associated communities in the wild-type *S. meliloti* strains GR4 and Rm1021. Interestingly, this molecule also affects motility and biofilm formation in phylogenetically distant bacteria including plant and animal pathogens. Although the effects on motility were variable

depending on the bacterial species (stimulatory for phytopathogenic bacteria of the *Pseudomonas* complex, and inhibitory in the case of animal pathogens such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella enterica*), in all cases the presence of 2-TDC reduced biofilm formation without affecting growth.

Application of 2-TDC in the early stages of the *S. meliloti*-alfalfa interaction led to a delay in the appearance of the first nodules, and to a reduction in the number of nodules developed per plant, an effect that was dose-dependent. We have also demonstrated that 2-TDC protects tomato plants against the development of bacterial speck disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Application of this MK delayed and reduced the appearance of disease symptoms (brown necrotic spots in leaves), also in a dose-dependent manner. In both examples of plant-bacteria interactions, the effect caused by 2-TDC correlated with a reduced bacterial capacity to colonize plant tissues (alfalfa roots in the case of *S. meliloti* and the apoplast in *P. syringae*). This defect in colonization, which is coherent with the reduced ability to form biofilms in the presence of 2-TDC, could account for the negative impact of the MK in the establishment of plant-bacteria associations. However, we cannot rule out the possibility that 2-TDC is recognized by the plant and triggers some type of response that interferes with the colonization and infection processes. In support of this idea, we have observed that alfalfa plants treated with 2-TDC before inoculation with *S. meliloti* also exhibit defects in nodulation kinetics, even when bacterial cells were never in contact with the MK.

Our results indicate that 2-TDC is a new signal molecule in bacteria that might participate in intra- and interspecific communication, as well as interkingdom communication, which could have important consequences for the ecology of these microorganisms.

By using solid-phase microextraction (SPME) (Semenov *et al.* 2002), a specific technique for the collection of volatiles, in combination with gas chromatography and mass spectrometry (GC/MS) analyses, we have shown, for the first time, that a wild type strain of *S. meliloti* also produces 2-TDC upon growth on semisolid media. Moreover, the activity of FadD has been found to regulate production levels of the MK.

The number of studies showing the properties of bacterial volatile compounds as airborne signalling molecules is rapidly increasing (Audrain *et al.* 2015a; Kim *et al.* 2013). However, mechanisms by which these volatiles are perceived and trigger their response in bacteria are mostly unknown. We have demonstrated that structural features of 2-TDC determine its biological activity as an inducer of motility in *S. meliloti*.

Thus, the chain length and the position of the carbonyl group are important in order to promote surface translocation. This suggests the existence of receptor-mediated specific recognition. Previous data revealed that in the presence of volatile 2-TDC flagellar genes are overexpressed in *S. meliloti* grown on surfaces, which is consistent with the flagella-dependent movement induced by the MK. However, 2-TDC also stimulates a flagella-independent translocation whose mechanism is still unknown. Our results indicate that this type of movement cannot be explained by 2-TDC acting as a surfactant or by MK caused alterations in cell morphology or physical properties of the cell envelope. On the other hand, surface motility and biofilm formation are phenotypes controlled by *quorum sensing* (QS) in many bacteria (Papenfort & Bassler 2016). We could not detect changes in the expression of *S. meliloti* QS genes in response to 2-TDC. However, our investigations have revealed that *S. meliloti* accumulates QS signals, acyl-homoserine lactones (AHL), upon growth in liquid in the presence of 2-TDC, a phenomenon that could partially explain some of the effects caused by the MK. The fact that this accumulation also occurs in a *sinI* mutant (unable to produce AHL) suggests that 2-TDC interferes with the turnover or degradation of these signal molecules.

In order to obtain insights into the mechanism of action by which 2-TDC exerts its effects on *S. meliloti*, we have used two different strategies that constitute specific objectives of this Doctoral Thesis.

In the first, we isolated and characterized GR4-derived transposon mutants impaired in their response to 2-TDC in terms of surface motility induction. Genetic and phenotypic characterization of a total of 19 mutants led to several interesting results. Firstly, all the mutants were found to be defective in surface translocation under control conditions. This suggests that many determinants involved in the mechanism of action of 2-TDC participate in the control of bacterial surface motility. On the other hand, our data have revealed the participation of functionally diverse genes. Genes affected by the transposon insertion encoded flagella components (*flhA* and *flgG*), transporters (*smc01368*, *smc02160* and *smc04454*), a two-component regulatory system (*ntrYX*), proteins associated with lipid metabolism (*sma1398*), proteins involved in the turnover of the second messengers c-di-GMP (*smc03141* and *sma01379*) and ppGpp (*relA*), and genes with unknown function (*smc00190* and *smc02081*). Among these, the only transposon mutants completely insensitive to 2-TDC were those affected in *smc03141* and *ntrY*, which indicates that these genes play an important role in the mechanism of

action of the MK. In this Thesis, the mutant GRS577 affected in the *ntrY* gene was selected for a more in depth characterization.

In the mutant strain GRS577, the transposon interrupted the *ntrY* gene encoding the sensor kinase of the NtrY/NtrX two-component regulatory system. This system, which has been well studied in many different bacteria (Atack *et al.* 2013; Carrica *et al.* 2012; Ishida *et al.* 2002; Nogales *et al.* 2002; Pawlowski *et al.* 1991), is associated to the regulation of nitrogen metabolism. Recently, it has been reported that the regulator NtrX, but not its cognate sensor NtrY, controls motility and succinoglycan production (EPS I) in *S. meliloti*, and is important for nitrogen fixation (Wang *et al.* 2013). GRS577 is impaired in flagella synthesis on the one hand and overproduces EPS I on the other. EPS I overproduction is responsible for increased biofilm formation but not for its insensitiveness to 2-TDC. The mutant also shows altered cell morphology and higher susceptibility to salt stress. GRS577 induces nitrogen-fixing nodules in alfalfa but exhibits decreased competitive nodulation due to a reduced capacity for root colonization. However, the nodule formation of the mutant is affected by 2-TDC in the same manner as the parental strain. Complementation experiments indicate that both *ntrY* and *ntrX* account for all the phenotypes displayed by the *ntrY::Tn5* mutant. Ectopic overexpression of VisNR, the motility master regulator, was sufficient to rescue motility and competitive nodulation of the transposant. Transcriptomic profiling of GRS577 confirmed differential expression of *exo* and flagellar genes, and led to the demonstration that NtrY/NtrX allows for optimal expression of denitrification and *nifA* genes under microoxic conditions in response to nitrogen compounds.

In summary, characterization of GRS577 has extended our knowledge of the complex role played by NtrY/NtrX in phenotypes relevant for the free-living and symbiotic lifestyles of *S. meliloti*.

In the second strategy adopted in this Thesis to investigate the mechanism of action of 2-TDC, we aimed to identify genes of *S. meliloti* GR4 showing altered expression in the presence of the MK by using gene-trapping technology. This technique is based on the use of a modified Tn5 transposon carrying the operon coding for the luciferase enzyme (*luxCDABE* operon). Thus, the GR4 strain was subjected to mutagenesis with this construct, in which the *lux* operon served as a reporter to monitor the expression in the presence/absence of 2-TDC of those genes interrupted by the transposon.

With this strategy we have identified a putative efflux pump (encoded by *smb20347-smb20346-smb20345*) belonging to the RND family (Resistance, Nodulation, Cell Division), whose expression is activated in the presence of 2-TDC. The transposon mutant affected in this pump, GTR3033, in which the Tn5 interrupts the *smb20345* gene, showed high luminescence in the presence of the MK. We have demonstrated that the promoter region controlling the transcription of the pump-encoding genes is located upstream of *smb20347*. This gene putatively codes for a TetR-type transcriptional regulator that blocks the expression of the pump in the absence of its effector. Moreover, our data indicate that the mode of application (as a volatile or dissolved) and the amount of 2-TDC modulate the expression of the pump, for which an optimal concentration range for maximal expression could be achieved. On the other hand, structural features of the molecule are important in order to induce the expression of the operon. Thus, methylketones and aldehydes with a long carbon chain (C12-C16) show higher activity. Interestingly, AHL with long acyl chains substituted with a carbonyl functional group (very similar to the structure of the MK) also stimulate the expression of the pump.

Our results also show that the Tn5 insertion in *smb20345* leads to a reduced response to 2-TDC in terms of colony expansion on semisolid medium, without affecting growth of *S. meliloti* in the absence or presence of the MK or the ability of this bacterium to swarm or swim. However, inactivation of *smb20345* does not reduce the symbiotic capacity of *S. meliloti*. Despite the insensitiveness shown by GTR3033 to 2-TDC, the nodulation ability of this strain in the presence of the MK is reduced to levels comparable to that of the wild type.

In summary, results obtained with these analyses indicate that this pump could participate in the transport of chemical compounds involved in bacterial signalling (2-TDC or some AHL). This finding offers the possibility to design a biosensor which could be used to detect these types of molecules in different biological systems. Therefore, this tool might contribute to gain insights of the role played by these chemical cues in plant-bacteria interactions.

Resumen

Los rizobios son un grupo amplio de bacterias del suelo capaces de establecer simbiosis mutualistas fijadoras de nitrógeno con plantas leguminosas. Esta relación simbiótica despierta gran interés, no sólo por su importancia agronómica y ecológica, sino porque constituye un excelente modelo para el estudio de las interacciones planta-bacteria. Existe una gran información sobre los genes y mecanismos que regulan los aspectos más relevantes de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa como son los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno. Sin embargo, el conocimiento acerca de las etapas más tempranas de la interacción, que comprenden la adsorción bacteriana y la colonización de la superficie de la raíz, es todavía escaso. Fenotipos bacterianos asociados a la vida en superficie como el *swarming* y la formación de biopelículas, se han relacionado con la capacidad de diversas bacterias de colonizar e invadir a sus hospedadores eucariotas. El *swarming* es un tipo de translocación bacteriana en superficie, dependiente de flagelos, que permite el movimiento rápido y coordinado de toda una población sobre una superficie semisólida, y que conlleva un proceso de diferenciación. Las biopelículas por su parte son comunidades sésiles de microorganismos embebidos en una matriz de polisacáridos y unidos entre sí y a la superficie. Estos fenómenos opuestos han sido muy estudiados en bacterias patógenas, en las que se ha visto que ambos operan de forma coordinada, compartiendo en muchos casos elementos reguladores comunes, y aportan una serie de ventajas a las poblaciones bacterianas que los llevan a cabo como son, mayor resistencia frente a agentes antimicrobianos y mayor capacidad de invasión y virulencia (Kearns 2010; Verstraeten *et al.* 2008). Los pocos estudios que hay en bacterias beneficiosas como *Rhizobium*, indican que determinantes bacterianos implicados en *swarming* y/o formación de biopelículas, o que se expresan durante estos procesos, son importantes para la interacción con su planta hospedadora.

Sinorhizobium meliloti, el simbionte de alfalfa y modelo de estudio en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, es capaz de desplazarse sobre la superficie de medios semisólidos y formar biopelículas tanto en sustratos abióticos como bióticos (Bernabéu-Roda *et al.* 2015; Amaya-Gómez *et al.* 2015; Nogales *et al.* 2012; Fujishige *et al.* 2006a; Soto *et al.* 2002). Sin embargo, los determinantes bacterianos, así como las señales químicas que controlan dichos fenotipos son aún desconocidos. Las investigaciones realizadas en el grupo de la Dra. Soto han permitido identificar mecanismos de control que regulan de manera inversa *swarming* y formación de biofilm en esta bacteria (Amaya-Gómez *et al.* 2015). Uno de ellos implica la

participación de FadD, una acil-CoA ligasa implicada en la activación de ácidos grasos de cadena larga para su degradación mediante β -oxidación. La inactivación del gen *fadD* en *S. meliloti* promueve el desplazamiento en superficie, dificulta la formación de biopelículas e interfiere negativamente con la colonización y nodulación de raíces de alfalfa (Amaya-Gómez *et al.* 2015; Soto *et al.* 2002). La caracterización bioquímica de un mutante *fadD* de la cepa GR4 de *S. meliloti* reveló la acumulación de compuestos lipídicos, tales como ácidos grasos libres, el aldehído dodecanal y la metilcetona (MK) 2-Tridecanona, que se encontraron presentes en sobrenadante de cultivos del mutante pero no de la cepa parental. La evaluación de los distintos compuestos permitió comprobar que sólo la MK 2-Tridecanona (2-TDC) estimulaba dicho movimiento cuando era aplicada en el medio, estimulación que era dependiente de dosis. Posteriormente se vio que la 2-TDC en su forma volátil también inducía desplazamiento en superficie dependiente de dosis. Además dicho efecto es específico de la movilidad en superficie y afecta también a mutantes aflagelados de *S. meliloti*, lo que indica que la 2-TDC estimula movilidad en superficie mediada por mecanismos tanto dependientes como independientes de acción flagelar.

La 2-TDC es una metilcetona volátil conocida como insecticida natural. Producida en cantidades importantes por especies silvestres de tomate (*Solanum habrochaites* subsp. *glabratum*), se la ha relacionado con la alta resistencia innata de estas plantas frente al ataque de insectos herbívoros (Williams *et al.* 1980). Aunque en la literatura está descrita la producción de 2-TDC por diversas plantas (Kirillov *et al.* 2017; Ghribi *et al.* 2016; Antonious, 2013), animales (Soini *et al.* 2007; Wood *et al.* 1995) y numerosos aislados bacterianos (Lemfack *et al.* 2014), nunca antes se había descrito sus efectos sobre bacterias. Estudiar a nivel molecular cómo la 2-TDC es capaz de controlar la movilidad en superficie de una bacteria modelo que interacciona con plantas, así como investigar posibles efectos adicionales, podría desvelar nuevos componentes y mecanismos reguladores empleados por las bacterias durante la interacción con sus plantas hospedadoras. Este conocimiento podría ser utilizado para controlar la infección por bacterias patógenas, o para el diseño de microorganismos beneficiosos más efectivos.

Por todo ello, el **Objetivo General** de esta Tesis Doctoral ha sido identificar nuevos mecanismos moleculares que participan en las etapas iniciales del establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, a través de un estudio en profundidad de los efectos producidos por la 2-TDC en la biología de la bacteria modelo *S. meliloti*, tanto en vida libre como en simbiosis, y la identificación de algunas de las bases moleculares responsables del modo de acción de este compuesto.

Como parte del primer objetivo específico de la Tesis se ha evaluado cómo afecta la 2-TDC a la formación de biopelículas y la capacidad simbiótica de *S. meliloti*, confirmándose que la acumulación de la MK es responsable de algunos de los fenotipos generados por la mutación *fadD*. La 2-TDC redujo la capacidad de formar comunidades adheridas a superficie en las cepas silvestres GR4 y Rm1021 de *S. meliloti*. Curiosamente, hemos podido comprobar que esta molécula también afecta a la movilidad y la formación de biopelículas en bacterias filogenéticamente alejadas de *S. meliloti*, incluyendo patógenos vegetales y animales. Aunque el efecto de la MK en la movilidad es variable, pudiendo estimularlo (en bacterias fitopatógenas del complejo *Pseudomonas*) o inhibirlo (patógenos de animales como *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica*) según la especie bacteriana, en todos los casos estudiados, la presencia de 2-TDC disminuye la formación de biofilm sin llegar a afectar el crecimiento de estos microorganismos.

Cuando se analizó el efecto de la 2-TDC en el establecimiento de la simbiosis con plantas de alfalfa, se comprobó que la aplicación de la MK en etapas tempranas de la interacción provoca un retraso en la aparición de los primeros nódulos, así como una reducción significativa en el número medio de nódulos desarrollados por la planta a lo largo del tiempo, efecto que es dependiente de dosis. Por otro lado, hemos constatado el efecto protector que ejerce la 2-TDC en plantas de tomate frente al desarrollo de la mancha o peca bacteriana, enfermedad causada por la bacteria *P. syringae* pv *tomato* (Pto). La aplicación de la MK, con un efecto que también es dependiente de dosis, retrasa y reduce la aparición de los síntomas típicos de la enfermedad. En ambas interacciones planta-bacteria, el efecto causado por la 2-TDC se ha relacionado con una menor capacidad de la bacteria de colonizar los tejidos vegetales (colonización de la superficie de la raíz en el caso de *S. meliloti*, o crecimiento bacteriano en el apoplasto en el caso de Pto). Este efecto, que se correlaciona con la menor capacidad de formar biopelículas en superficies abióticas en presencia de la MK, podría ser la causa del efecto negativo de la 2-TDC en el establecimiento de la asociación planta-bacteria. No obstante, la posibilidad de que la 2-TDC esté siendo reconocida por la planta y desencadene respuestas que interfieran con el proceso colonizador e infectivo de la bacteria no es descartable. A favor de esta hipótesis está la observación realizada en esta Tesis de que plantas de alfalfa tratadas con 2-TDC previamente a la inoculación, siguen experimentando retraso en la cinética de nodulación, aun cuando el rizobio no está en contacto en ningún momento con la MK.

Estos resultados indican que la 2-TDC es una nueva molécula de señalización en bacterias que actuando como volátil, podría participar no sólo en comunicación intra- e

inter-específica sino incluso en comunicación con organismos superiores, con importantes consecuencias para la ecología de estos microorganismos.

Gracias a la adopción de una metodología específica para la detección de volátiles, microextracción en fase sólida (SPME) (Semenov *et al.*, 2002) y posterior análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), se ha podido demostrar por primera vez que una cepa silvestre de *S. meliloti* es capaz de producir 2-TDC volátil tras el crecimiento en medio mínimo semisólido. Además hemos comprobado que la actividad FadD contribuye a regular los niveles de producción de esta MK.

A pesar de la incesante aparición de estudios que muestran que compuestos volátiles producidos por bacterias tienen una función señalizadora (Audrain *et al.*, 2015a; Kim *et al.* 2013), los mecanismos de percepción y respuesta a estas señales son aún desconocidos. Nuestros análisis han mostrado que existe una dependencia entre la estructura y la actividad biológica de la 2-TDC. Así, tanto la posición del grupo carbonilo como la longitud de la cadena alifática determinan la capacidad de esta molécula para estimular el desplazamiento en superficie. Esto sugiere la existencia de un posible mecanismo de reconocimiento específico mediado por un receptor. Por otra parte, aunque el efecto promotor de la movilidad dependiente de flagelos tiene su explicación en una mayor expresión de genes flagelares inducida por la 2-TDC, aún se desconoce cuál es el origen del efecto ejercido en la movilidad independiente de flagelos. Nuestros resultados descartan que la 2-TDC actúe como surfactante o induzca cambios morfológicos o en ciertas propiedades fisicoquímicas de la envuelta celular. La movilidad en superficie y la formación de biopelículas son fenotipos que en diversas bacterias se encuentran regulados por *quorum sensing* (Papenfort & Bassler 2016). Las investigaciones realizadas en este trabajo de Tesis Doctoral indican que la 2-TDC no afecta la expresión de genes de *quorum sensing* en *S. meliloti*. Sin embargo, sí hemos podido observar una mayor acumulación de las moléculas señal acil-homoserina lactonas (AHL) en presencia de 2-TDC, que podrían ser responsables, al menos en parte, de los efectos causados por la MK. El hecho de que este fenómeno también tenga lugar en un mutante *sinI* de *S. meliloti*, incapaz de sintetizar AHL, sugiere que de algún modo la 2-TDC interfiere negativamente con el *turnover* o degradación de dichas moléculas señal.

Para obtener información adicional sobre el mecanismo de acción a través del cual la 2-TDC ejerce sus efectos en nuestra bacteria de estudio, se han seguido dos aproximaciones distintas que constituyen objetivos específicos de la Tesis Doctoral.

En una de ellas, recogida en el Capítulo 2, se procedió al aislamiento y caracterización de transposantes derivados de la cepa GR4 de *S. meliloti* que fuesen insensibles a 2-TDC; esto es, no incrementasen su capacidad de translocación en superficie en respuesta a la MK, o lo hiciesen en un menor grado en comparación a la cepa parental. Los resultados derivados de la caracterización genética y fenotípica de un total de 19 transposantes han permitido obtener datos interesantes acerca del modo de acción de la 2-TDC. En primer lugar, todos los mutantes afectados en la respuesta en movilidad frente a 2-TDC lo estaban también en su capacidad para desplazarse en superficie. Esto sugiere que gran parte de los componentes implicados en el mecanismo de acción de la MK participan en el control de la movilidad bacteriana en superficie. Por otro lado, los genes afectados por el transposón fueron muy diversos desde el punto de vista funcional, habiéndose identificado genes que codifican componentes del flagelo (*flhA* y *flgG*), transportadores (*smc01368*, *smc02160* y *smc04454*), un sistema regulador de dos componentes (*ntrYX*), proteínas implicadas en metabolismo lipídico (*sma1398*), proteínas que participan en metabolismo de los segundos mensajero di-GMPc (*smc03141* y *sma01379*) y ppGpp (*relA*) y genes con función desconocida (*smc00190* y *smc02081*). De entre los 12 genes identificados, sólo los transposantes afectados en *smc03141* y en *ntrY* resultaron ser completamente insensibles a 2-TDC, apuntando así a su papel relevante en el mecanismo de acción de la MK. En esta Tesis, se decidió caracterizar en profundidad uno de los mutantes afectados en *ntrY*, GRS577.

En el mutante GRS577, el transposón interrumpe la secuencia del gen *ntrY*, el cual codifica una histidina quinasa de membrana que actúa como sensor del sistema regulador de dos componentes NtrY/NtrX. Este sistema, el cual ha sido estudiado en diversas especies de bacterias (Atack *et al.* 2013; Carrica *et al.* 2012; Ishida *et al.* 2002; Nogales *et al.* 2002; Pawlowski *et al.* 1991), se ha asociado al control del metabolismo nitrogenado. Recientemente, se ha descrito que el regulador NtrX, pero no NtrY, controla movilidad y producción de succinoglucano (EPS I) en *S. meliloti*, y es necesario para la fijación de nitrógeno (Wang *et al.* 2013). GRS577 presenta defectos en movilidad en superficie y *swimming* como consecuencia de estar afectado en la síntesis de flagelos. Además, súper-produce EPS I, el cual es responsable de un incremento en la formación de biofilm pero no de la insensibilidad del mutante a 2-

TDC. GRS577 también muestra una morfología alterada y mayor susceptibilidad a estrés salino. Aunque el transposante induce la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en alfalfa, exhibe menor capacidad competitiva por la ocupación de los mismos que probablemente es consecuencia de su menor capacidad para colonizar las raíces de alfalfa. No obstante, está igual de afectado en la nodulación que la cepa silvestre en presencia de 2-TDC. Experimentos de complementación revelaron que tanto *ntrY* como *ntrX* son responsables de los fenotipos mostrados por el mutante *ntrY::Tn5*. La sobre-expresión ectópica del regulador maestro flagelar VisNR fue suficiente para restaurar el defecto en movilidad y en competitividad del transposante. Un análisis transcriptómico confirmó la expresión diferencial de genes *exo* y genes flagelares, y permitió demostrar que el sistema NtrY/NtrX contribuye a la expresión óptima del gen *nifA* y de los genes de desnitrificación en condiciones microaeróbicas en respuesta a la presencia de nitrato. En resumen, la caracterización fenotípica del transposante GRS577 ha permitido extender el conocimiento sobre el papel complejo que juega el sistema NtrY/NtrX en la biología de *S. meliloti*, controlando fenotipos relevantes tanto para el estado de crecimiento en vida libre como para la interacción simbiótica con alfalfa (Calatrava-Morales *et al.* 2017).

En la segunda aproximación abordada en la Tesis con el objetivo de seguir indagando en el mecanismo de acción de la 2-TDC, y recopilada en el Capítulo 3, se procedió a la identificación de genes de *S. meliloti* GR4 cuya expresión se viese alterada significativamente en presencia de la MK utilizando la tecnología de las trampas génicas. Dicha estrategia se basó en someter a la cepa GR4 a una mutagénesis generalizada con un transposón Tn5 modificado, el cual contenía el operón *luxCDABE* que codifica el enzima luciferasa. Dicho operón nos serviría como construcción reportera para monitorizar la expresión en presencia o ausencia de 2-TDC del gen afectado por la inserción del transposón a través de la medición de la intensidad lumínica emitida por el correspondiente mutante.

Gracias a esta estrategia hemos podido identificar una bomba de extrusión de la familia RND (del inglés, *Resistance, Nodulation, Cell Division*), codificada por el operón *smb20347-smb20346-smb20345*, cuya expresión se activa en presencia de 2-TDC. El transposante afectado en esta bomba, GTR3033, en el que el Tn5 interrumpe la secuencia de *smb20345*, mostró altos niveles de luminiscencia como consecuencia de la inducción por la MK. Nuestros resultados indican que la región promotora encargada de dirigir la transcripción de los genes de la bomba está situada aguas arriba de

smb20347, el gen codificante del teórico regulador transcripcional TetR que actuaría como represor de la bomba en ausencia de la señal efectora. Además, hemos comprobado que la expresión de esta bomba está modulada por la cantidad de 2-TDC aplicada, existiendo un rango de concentraciones óptimo, y que también la forma de aplicación de la MK (como volátil o disuelta) tiene efectos en la inducción de la misma. Por otro lado, hemos podido constatar la influencia de la estructura química en la capacidad para inducir la expresión del operón. Así, metilcetonas y aldehídos de cadena larga (C12-C16) muestran mayor actividad inductora. Del mismo modo, AHL conteniendo grupos acilo de cadena larga y con un sustituyente carbonilo también inducen la expresión de la bomba.

La inserción del transposón en *smb20345* no afecta al crecimiento de *S. meliloti* ni a su capacidad para desplazarse en superficie o mediante motilidad *swimming*, pero sí confiere cierta insensibilidad a la 2-TDC, medida en términos de expansión de la colonia en medio semisólido. en presencia o ausencia de 2-TDC. La capacidad simbiótica de la bacteria no se ve alterada por la mutación en la bomba, ya que el transposante GTR3033 es capaz de inducir la formación de nódulos, así como también, de competir por la ocupación de los mismos de forma tan eficiente como la cepa silvestre. Tampoco su aparente insensibilidad a 2-TDC produce ningún efecto en la nodulación en presencia de dicho compuesto, de forma que plantas de alfalfa inoculadas con el mutante en la bomba siguen experimentando el mismo retraso que las inoculadas con la cepa silvestre GR4 si se adiciona la MK.

Aunque es necesario seguir investigando en mayor profundidad, los resultados obtenidos de estos análisis apuntan a que esta bomba participaría en el transporte de compuestos con función señalizadora en bacterias, lo que abre la posibilidad del diseño de un biosensor que permitiría la detección de este tipo de moléculas en distintos sistemas biológicos.

Índice de contenidos

Introducción

1. Aspectos generales de la movilidad bacteriana.....	3
1.1. El flagelo como motor de propulsión. Modelo en enterobacterias.....	4
1.2. Estructura y regulación de la maquinaria flagelar en <i>Sinorhizobium meliloti</i>	9
2. Principales características de la movilidad swarming.....	11
2.1. Desafíos del <i>swarming</i>	13
2.2. Señales que desencadenan el <i>swarming</i>	15
2.3. Diferenciación a célula <i>swarmer</i>	18
2.4. <i>Swarming</i> , biopelículas y virulencia.....	20
3. Señales químicas que controlan el <i>swarming</i> y la formación de biopelículas en bacterias.....	24
3.1. Señales de <i>quorum sensing</i>	24
3.1.1. Acil-homoserina lactonas.....	25
3.1.2. Ácidos grasos (familia DSF).....	27
3.1.3. Familia de las α -hidroxicetonas.....	30
3.2. Compuestos volátiles.....	31
4. Simbiosis <i>Rhizobium</i>-leguminosa.....	33
4.1. Simbiosis <i>Sinorhizobium meliloti</i> – alfalfa.....	36
5. Importancia del <i>swarming</i> y la formación de biopelículas en la simbiosis <i>Rhizobium</i>-leguminosa.....	38
6. Identificación de la 2-Tridecanona y evaluación de sus efectos en motilidad en <i>Sinorhizobium meliloti</i>.....	46
Objetivos.....	53

Materiales y Métodos

1. Técnicas microbiológicas.....	57
1.1. Cepas y plásmidos utilizados.....	57
1.2. Medios de cultivo.....	60
1.3. Antibióticos.....	62
1.4. Preparación de las metilcetonas (MK) y las acil-homoserina lactonas (AHL).....	63
1.5. Conservación de cepas bacterianas.....	63
1.6. Conjugaciones biparentales.....	64
1.7. Ensayos de movilidad bacteriana en superficie.....	64
1.8. Ensayos de movilidad <i>swimming</i>	65
1.9. Ensayos de formación de biopelículas.....	65
1.9.1. Formación de biopelículas en cámaras sobre soporte de vidrio.....	65
1.9.2. Formación de biopelículas en tubo de vidrio.....	66
1.10. Curvas de crecimiento.....	66
2. Técnicas de biología molecular.....	66
2.1. Aislamiento de ADN plasmídico.....	66
2.1.1. Mini preparación mediante lisis alcalina.....	66
2.1.2. Mini preparación de ADN plasmídico con el kit Genelute plasmid (SIGMA).....	68
2.2. Aislamiento de ADN genómico total.....	69
2.3. Aislamiento de ARN total de <i>S. meliloti</i>	70
2.4. Concentración de muestras de ARN total de <i>S. meliloti</i>	71
2.5. Estimación de la concentración de ADN y ARN.....	71
2.6. Manipulación del ADN.....	72
2.6.1. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción.....	72
2.6.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	72

2.6.3.	Revelado de geles y fotografía	72
2.6.4.	Estimación del tamaño molecular de los fragmentos de ADN	73
2.6.5.	Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	73
2.6.6.	Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación	74
2.7.	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	74
2.8.	Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	75
2.9.	Experimentos de hibridación ADN-ADN.....	75
2.9.1.	Transferencia de ADN a filtros de nylon	75
2.9.2.	Marcaje de sondas de ADN no radioactivas.....	77
2.9.3.	Hibridación ADN-ADN con sondas de ADN no radioactivas	77
2.10.	Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	78
2.11.	Amplificación de ADN mediante PCR arbitraria.	79
2.12.	Mutagénesis <i>in vitro</i> por delección mediante PCR solapante.....	80
2.13.	Secuenciación automática de ADN de doble cadena.	81
2.14.	Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas.	81
2.15.	Experimentos de <i>microarrays</i>	81
2.15.1.	Reversotranscripción del ARN.....	81
2.15.2.	Hidrólisis de ARN	82
2.15.3.	Marcaje del ADNc	82
2.15.4.	Procesamiento del <i>microarray</i> previo a la hibridación	83
2.15.5.	Hibridación de los <i>microarrays</i>	84
2.15.6.	Procesamiento del <i>microarray</i> tras la hibridación.....	84
2.15.7.	Adquisición de la imagen y tratamiento de los datos.....	85
2.16.	RT- qPCR (<i>Reverse transcription quantitative real-time PCR</i>).	85
2.16.1.	Síntesis de ADNc para RT-qPCR	85
2.16.2.	Reacción de amplificación para la cuantificación de la expresión génica relativa. RT-qPCR	86
2.16.3.	Cálculo de la eficiencia de los oligonucleótidos para RT-qPCR.....	87
2.16.4.	Cálculo de las expresiones relativas	88
3.	Ensayos con plantas.	88
3.1.	Ensayos con plantas de alfalfa.....	88
3.1.1.	Esterilización y germinación de semillas	88
3.1.2.	Solución nutritiva para el cultivo de plantas.....	89
3.1.3.	Cultivo axénico de plantas	89
3.1.4.	Medida del grado de infectividad	89
3.1.5.	Experimentos de adsorción – colonización	90
3.1.6.	Medida del grado de competitividad	91
3.2.	Ensayos con plantas de tomate	91
3.2.1.	Preparación del inóculo	91
3.2.2.	Ensayo de infección individual.....	92
4.	Técnicas analíticas.	92
4.1.	Detección de 2-TDC volátil en <i>S. meliloti</i> mediante microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (SPME-GC/MS).....	92
4.2.	Detección de AHL en cultivos líquidos de <i>S. meliloti</i>	93
4.2.1.	Detección de AHL con la cepa indicadora de <i>S. meliloti</i>	94
4.2.2.	Detección de AHL con la cepa indicadora de <i>A. tumefaciens</i>	94
4.3.	Determinación de la actividad β -galactosidasa en cultivos celulares.	95
4.4.	Detección y determinación de bioluminiscencia.....	97
4.5.	Ensayos de colapso de gota.	98
5.	Técnicas de microscopía.....	98

Resultados

Capítulo 1:

1. Efecto de la 2-Tridecanona en los modos de vida libre y simbiótico de <i>S. meliloti</i>...	101
1.1. Importancia de las características estructurales en la promoción de la movilidad en superficie ejercida por la 2-Tridecanona.....	101
1.2. Efecto de la 2-Tridecanona en la morfología y las propiedades de la envuelta celular en <i>S. meliloti</i> GR4.....	105
1.3. La 2-Tridecanona afecta negativamente a la formación de biopelículas de <i>S. meliloti</i>	106
1.4. Evaluación del efecto de la 2-Tridecanona en la regulación del <i>quorum sensing</i> en <i>S. meliloti</i>	107
1.5. La 2-Tridecanona interfiere negativamente con la capacidad simbiótica de <i>S. meliloti</i>	121
1.5.1. El efecto negativo en simbiosis de la 2-TDC podría ser ejercido a través de la planta.....	124
1.6. Efecto de la 2-Tridecanona sobre fenotipos asociados al crecimiento en superficie en otras bacterias.....	125
1.7. La aplicación de 2-TDC en plantas de tomate protege de la infección por el patógeno <i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>	127
1.8. La cepa GR4 de <i>S. meliloti</i> produce 2-Tridecanona.....	129

Capítulo 2:

2. Identificación y caracterización de genes de <i>Sinorhizobium meliloti</i> implicados en el mecanismo de acción de la 2-Tridecanona.....	133
2.1. Obtención y selección de mutantes derivados de <i>S. meliloti</i> GR4 afectados en movilidad en superficie en respuesta a 2-TDC.....	133
2.2. Caracterización genética de los transposantes afectados en movilidad en respuesta a 2-TDC.....	136
2.2.1. Caracterización genética de los transposantes GRS.....	136
2.2.2. Caracterización genética de los transposantes GTI.....	139
2.3. Caracterización fenotípica de los transposantes afectados en movilidad en respuesta a 2-TDC.....	141
2.3.1. Evaluación de la movilidad en superficie, respuesta a 2-Tridecanona y movilidad <i>swimming</i> en los transposantes GRS.....	142
2.3.2. Evaluación de la movilidad en superficie, respuesta a 2-Tridecanona y movilidad <i>swimming</i> en los transposantes GTI.....	145
2.4. Caracterización fenotípica del transposante GRS577. Papel del sistema regulador de dos componentes NtrY/NtrX en el control de fenotipos en vida libre y en simbiosis de <i>S. meliloti</i> GR4.....	152
2.4.1. Tanto <i>ntrY</i> como <i>ntrX</i> participan en el control de la movilidad y la producción de EPS I en <i>S. meliloti</i> GR4.....	157
2.4.2. Otros fenotipos asociados a la cepa GRS577: mayor formación de biopelículas y mayor sensibilidad a estrés salino.....	161
2.4.3. Los defectos en motilidad de GRS577 dificultan la colonización de raíz y reducen la competitividad por la nodulación de alfalfa.....	162
2.4.4. Análisis transcriptómico de GRS577.....	164
2.4.5. El sistema NtrY/NtrX de <i>S. meliloti</i> regula la expresión de los genes de desnitrificación y del gen <i>nifA</i>	166
Anexo 2.1 Estrategias para la construcción de los distintos plásmidos y cepas empleados en el Capítulo 2.....	171

Anexo 2.2 Listado de los genes diferencialmente expresados obtenidos del transcriptoma de <i>S. meliloti</i> GR4 y su derivado <i>ntrY::Tn5</i> GRS577.	177
--	------------

Capítulo 3:

3. Identificación y caracterización de genes de <i>Sinorhizobium meliloti</i> regulados por 2-Tridecanona	185
--	------------

3.1. Identificación de genes de <i>S. meliloti</i> GR4 inducidos o reprimidos en respuesta a 2-TDC.	185
3.2. Caracterización genética de los transposantes que responden a 2-TDC.	188
3.3. Caracterización fenotípica del transposante GTR3033.	190
3.3.1. Crecimiento y movilidad	190
3.3.2. Identificación del promotor activado por 2-TDC	192
3.3.3. Mutagénesis dirigida sobre <i>smb20345</i> y complementación	194
3.3.4. Respuesta del transposante GTR3033 a 2-TDC en diferentes condiciones de cultivo.	196
3.3.5. Respuesta del transposante GTR3033 a otros compuestos	198
3.3.6. Fenotipo simbiótico del transposante GTR3033.	204

Anexo 3.1 Estrategia para la identificación del sitio de inserción del mini-<i>Tn5 luxCDABE</i> en los transposantes GTR.	209
--	------------

Anexo 3.2 Estrategias para la construcción de los distintos plásmidos y cepas empleados en el Capítulo 3.	210
--	------------

Discusión general	215
--------------------------	------------

Conclusions	243
--------------------	------------

Bibliografía	249
---------------------	------------

INTRODUCCIÓN

1. Aspectos generales de la movilidad bacteriana.

La capacidad de desplazarse activamente por el medio que les rodea es uno de los mecanismos adaptativos que las bacterias han desarrollado a lo largo de la evolución para lograr sobrevivir a las condiciones cambiantes del entorno. Las bacterias pueden dirigir el movimiento en respuesta a una gran variedad de estímulos, tanto físicos como químicos. Esto último se conoce como quimiotaxis, que se describe como la capacidad de orientar la movilidad en función del gradiente de concentración de una determinada sustancia atrayente o repelente. Gracias a la movilidad y la quimiotaxis las bacterias pueden mejorar la eficiencia en la adquisición de nutrientes, huir de la presencia de compuestos tóxicos, dispersarse por el medio y colonizar nuevos nichos más favorables para su subsistencia.

Las estrategias y herramientas empleadas para llevar a cabo el desplazamiento son muy diversas. En general, podemos distinguir entre dos tipos de desplazamiento en función del medio en el que tienen lugar: desplazamiento en medios líquidos o *swimming* y desplazamiento sobre superficies (Kearns 2010; Henrichsen 1972). El *swimming* es un movimiento impulsado por la rotación de los flagelos que tiene lugar en las células a nivel individual. En cuanto al movimiento en superficie encontramos cuatro tipos principalmente (Figura I.1):

1. *Sliding*: Es un movimiento pasivo, que se genera por acción de las fuerzas expansivas de la colonia al crecer sobre la superficie y está facilitado por la producción de surfactantes y exopolisacáridos, que reducen la tensión superficial del medio y facilitan el deslizamiento.
2. *Twitching*: Es un movimiento que, al igual que el *swimming*, tiene lugar a nivel individual y se produce por la extensión y retracción de pili tipo IV.
3. *Gliding*: Este tipo de movimiento no requiere de flagelos o pili. Tiene lugar a lo largo del eje longitudinal de la célula a través del uso de complejos focales de adhesión, estructuras asociadas a la envuelta celular que se anclan al sustrato y pueden actuar como un motor.
4. *Swarming*: Es un movimiento dependiente de flagelos, pero a diferencia del *swimming*, el *swarming* es un comportamiento multicelular que implica el desplazamiento rápido y coordinado de toda una población bacteriana sobre una superficie, formando grupos que se conocen como *rafts*. Está facilitado por la acción de surfactantes y tiene la particularidad de estar asociado a procesos de diferenciación celular que en algunas ocasiones se traducen en cambios morfológicos bastante drásticos.

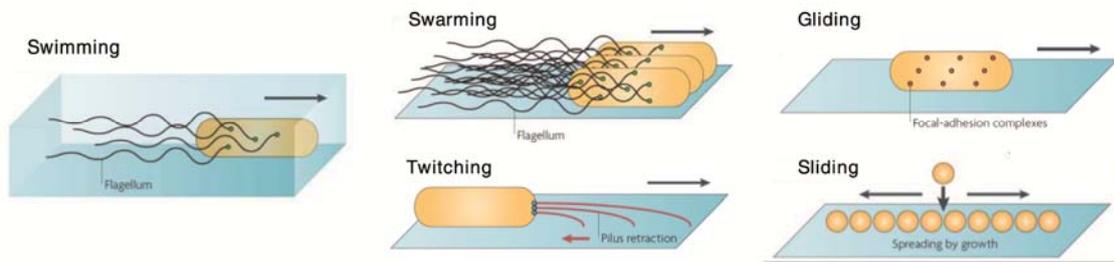


Figura I.1: Tipos de movilidad en bacterias. Imagen tomada de Kearns (2010).

1.1. El flagelo como motor de propulsión. Modelo en enterobacterias.

Junto con los pili, los flagelos son los principales órganos de locomoción bacteriana. Se trata de apéndices filamentosos, largos y finos (10-15 micras de longitud y 20 nm de diámetro), con forma helicoidal, que tienen una estructura extraordinariamente compleja dividida en al menos tres partes: el cuerpo basal, el gancho y el filamento. El cuerpo basal está embebido en las membranas celulares, atravesando la pared bacteriana y llegando hasta el citoplasma, mientras que el gancho y el filamento se extienden hacia la parte exterior (Morimoto & Minamino, 2014).

La estructura, el proceso de ensamblaje de la misma y su regulación en las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* constituyen el paradigma del flagelo en Gram-negativas (Figura I.2). En estas bacterias el movimiento rotatorio del flagelo se produce gracias a la energía proporcionada por la fuerza protón motriz (flujos de protones a través de la membrana citoplasmática) (Chevance & Hughes 2008).

El cuerpo basal tiene dos funciones principales: es el encargado de anclar el flagelo a la envuelta celular y es el principal responsable del movimiento del flagelo, ya que actúa de motor rotatorio capaz de girar en ambos sentidos (Morimoto & Minamino 2014; Smith & Hoover 2009).

En bacterias Gram-negativas se distinguen cuatro anillos que conforman el cuerpo basal: un anillo L (FlgH) embebido a la membrana externa de lipopolisacárido; otro anillo P (FlgI), que se encuentra en la pared celular (capa de peptidoglucano); un tercero denominado anillo MS (FliF) y conformado por dos estructuras, una en la región periplásmica y otra inserta en la membrana plasmática; y por último el anillo C (FliG, FliM y FliN), asociado también a la membrana pero por el lado citoplasmático. Fuertemente unido al anillo MS aparece el eje o cilindro del rotor (FliE FlgB, FlgC, FlgF, FlgG), una estructura tubular que se extiende hasta el gancho y que actúa como

eje de transmisión. Asociadas al cilindro encontramos a FlhE, FliE y FliL que sirven para mantener la integridad del mismo y mejoran la secreción de las proteínas flagelares.

El motor está compuesto por el rotor y los estatores. El rotor lo conforman las proteínas de los anillos MS y C, siendo éste último el encargado de los cambios de giros en el motor, a favor o en contra de las agujas del reloj. Por su parte, el estator rodea al rotor y está formado por múltiples copias de dos proteínas integrales de membrana, MotA y MotB.

Por último, situado dentro del canal central del anillo MS, se encuentra el sistema de secreción tipo III (T3SS), que transporta la mayoría de las proteínas flagelares hacia la zona de ensamblaje. La energía necesaria para la secreción no proviene de la hidrólisis de ATP, sino de la fuerza protón-motriz generada por la entrada de protones a través de un espacio entre los anillos MS y C.

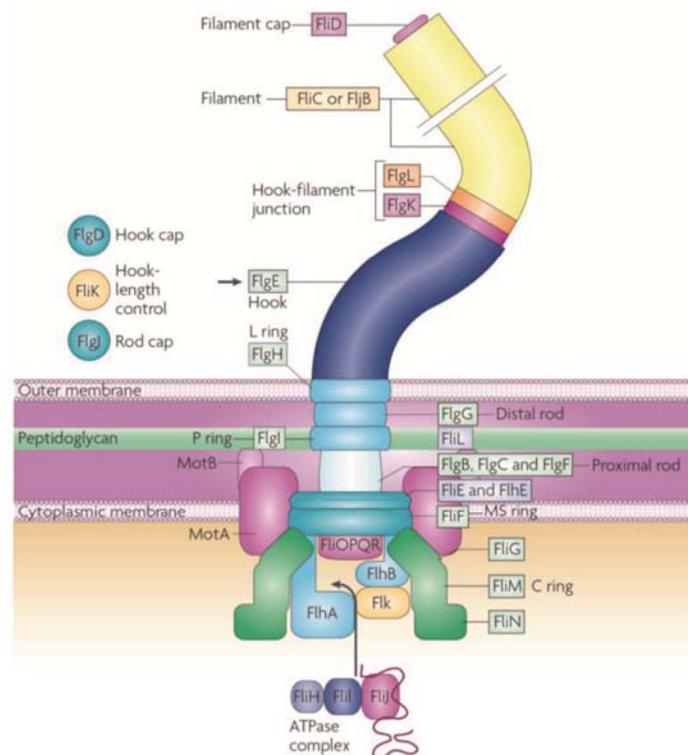


Figura I.2: Representación esquemática de los componentes del flagelo (modelo en enterobacterias). Imagen tomada de Chevance & Hughes (2008).

El gancho, también denominado codo, es un cilindro curvado y flexible formado por más de 130 unidades de la proteína FlgE. Actúa como una bisagra, transmitiendo el movimiento de torsión generado por el motor hasta el filamento y convirtiéndolo en un

movimiento ondulatorio. Al final del gancho están las proteínas de unión con el filamento FlgK y FlgL.

Finalmente, en la parte más externa encontramos el filamento, un tubo hueco helicoidal formado por más de 20000 subunidades de una o varias proteínas, denominadas flagelinas, que se ensamblan paralelamente al eje. Generalmente la proteína FliC es la flagelina que conforma el filamento, pero en algunas bacterias puede haber más de un tipo de flagelina. En el extremo distal del flagelo se encuentra la proteína de recubrimiento, formada por cinco monómeros de FliD.

El movimiento del flagelo se produce cuando, con la ayuda de la fuerza protón motriz generada por el estator, el rotor gira. Las proteínas del estator se acoplan y desacoplan continuamente del rotor conduciendo el flujo de protones sólo cuando están acopladas. En ese estado, MotA presenta una conformación tal que le permite interactuar con la proteína del anillo C FliG, que está en contacto con el anillo MS. Esta interacción con MotA provoca el movimiento de FliG, generándose el movimiento de rotación. Éste es transmitido por el anillo MS al cilindro central, de ahí se transmite al codo y de éste al filamento (Figura 1.3). Como el filamento es una hélice rígida, al girar hace avanzar a la bacteria en el medio (Harshey & Partridge 2015; Smith & Hoover 2009).

El giro del motor puede darse en contra (CCW, Counter-ClockWise) o a favor (CW, ClockWise) de las agujas del reloj. Cuando todos los motores giran en la misma dirección (CCW por defecto) los filamentos se disponen en haz y se produce un movimiento natatorio suave. Cuando uno o más motores cambian el sentido de giro a CW, el movimiento uniforme del haz se rompe, los flagelos se agitan y cambian la dirección del movimiento. Los cambios de sentido están desencadenados por los estímulos que las bacterias perciben del exterior. La mayoría de ellos son percibidos por quimiorreceptores, proteínas transmembrana MCP (Methyl-acccepting Chemotaxis Protein) del sistema de quimiotaxis, y dicha percepción desencadena un proceso de transducción de señales que acaba con la fosforilación de un regulador, CheY. CheY-P interacciona con las proteínas inferiores (FliM y FliN) del anillo C, lo que provoca un cambio conformacional de la proteína superior FliG y finalmente el cambio de sentido en la rotación (Harshey & Partridge 2015; Morimoto & Minamino 2014).

Para la formación de las distintas estructuras del flagelo, las proteínas flagelares deben ser exportadas desde el citoplasma hasta la zona de crecimiento de la correspondiente estructura. Las proteínas a exportar poseen una secuencia peptídica

en el extremo N-terminal que es específicamente reconocida por el T3SS, encargado de su secreción. Este aparato de exportación está formado por siete proteínas de membrana: FliA, FliB, FliF, FliO, FliP, FliQ, y FliR, y tres proteínas solubles: FliH, FliI, y FliJ. Dado que, como veremos, el proceso de ensamblaje del flagelo es secuencial, el T3SS es capaz de discernir entre las proteínas necesarias para la estructura del cuerpo basal y el gancho de aquellas requeridas para la formación del filamento. Esto lo hace en parte gracias a las chaperonas específicas de sustrato; el transporte de FlgK, FlgL, FliC, y FliD (específicas del filamento), requieren de FlgN para FlgK y FlgL, FliS para FliC y FliT para FliD. De este modo, estas chaperonas, además de dirigir a sus sustratos afines hasta el sistema de exportación, los protegen tanto de la degradación como de la agregación en el citoplasma (Chevance & Hughes 2008).

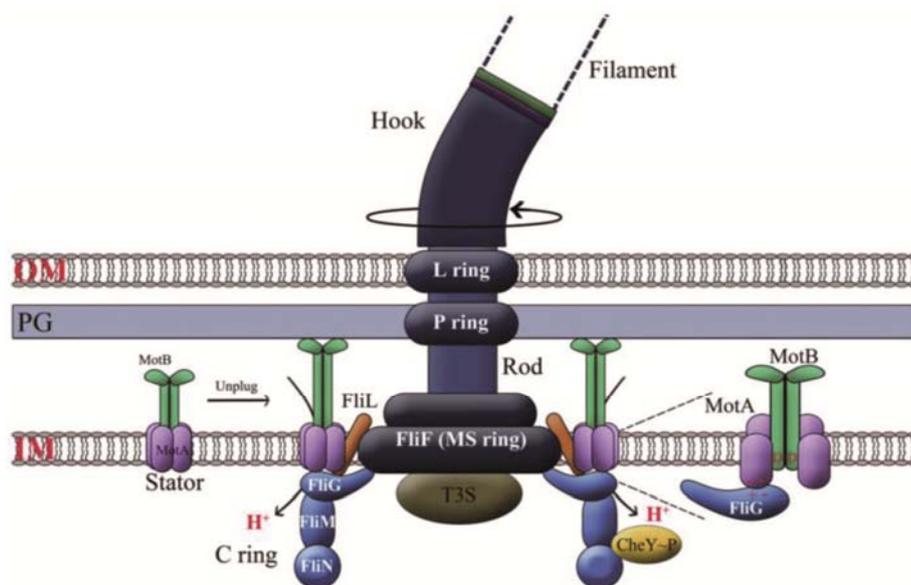


Figura I.3: Representación esquemática de la estructura del motor flagelar (modelo en enterobacterias). Se muestran las proteínas del anillo C (FliG, FliM, y FliN), el anillo MS de la membrana interna (IM), el cilindro y los anillos P y L, el gancho y el filamento. Asociadas al anillo C están las proteínas del estator (MotA/B) y el regulador de quimiotaxis CheY-P. En contacto con el estator y el rotor vemos a FliG y FliL. La interacción entre MotA y FliG se indica en la región expandida. Imagen tomada de Harshey & Partridge 2015.

La síntesis del flagelo bacteriano es un proceso complejo que implica la actividad de docenas de genes estructurales y reguladores. Al conjunto de estos genes se le conoce como regulón flagelar. Los llamados reguladores maestros se encuentran en la parte superior del regulón gobernando todo el proceso de biosíntesis. La organización de los genes flagelares varía entre especies; en algunas, se encuentran dispuestos dentro de operones agrupados juntos en el cromosoma (*Sinorhizobium meliloti*), mientras que en otras están dispuestos en más de 20 operones dispersos por todo el

genoma (*Helicobacter pylori*). Aunque los genes implicados en la biosíntesis flagelar están muy conservados entre especies bacterianas, los mecanismos reguladores que los controlan así como el regulador maestro son divergentes. En enterobacterias, más de 50 genes están implicados en el ensamblaje de flagelos, movilidad y quimiotaxis (Patrick & Kearns 2012; Smith & Hoover 2009).

El ensamblaje del flagelo es un proceso altamente regulado en el que los genes se transcriben de forma jerárquica y ordenada en función de las necesidades durante el ensamblaje. La regulación temporal de los genes flagelares asegura el adecuado orden en la síntesis de las proteínas de la estructura del flagelo, ya que deben ser sintetizadas a medida que se van necesitando. El propio flagelo monitoriza el estado de su ensamblaje y comunica esta información a sistemas reguladores que controlan la expresión de los diferentes conjuntos de genes flagelares. De esta manera se consigue la expresión secuencial de los mismos (Anderson *et al.* 2010; Smith & Hoover 2009).

En la biosíntesis del flagelo, primero ha de generarse el cuerpo basal, seguido del gancho y finalmente el filamento. Cada una de estas estructuras debe alcanzar un tamaño y una composición determinada antes de que se forme la estructura siguiente. Para ello, la cascada reguladora que coordina la expresión génica y el ensamblaje posee una serie de puntos de chequeo. De acuerdo al orden secuencial de su expresión, los genes del regulón flagelar se distribuyen en 3 clases (Figura 1.4):

- Clase I. Corresponde al regulador maestro. En el caso de *E. coli* o *Salmonella* está constituido por el operón bicistrónico *flhDC*. Dicho regulador maestro es un activador transcripcional global que regula la expresión de los genes de la Clase II. Existe una gran diversidad de reguladores que activan o reprimen FlhDC en respuesta a diferentes estímulos. De esta manera las señales percibidas por la bacteria se integran en el regulón flagelar.

- Clase II. En ella se incluyen los genes que codifican las proteínas del cuerpo basal del flagelo, los componentes del T3SS, las proteínas del gancho y las proteínas reguladoras FliA y FlgM. Todas ellas son activadas por el regulador maestro. FliA codifica un factor σ^{28} necesario para la transcripción de los genes de la Clase III. Por su parte, FlgM codifica el factor anti-sigma que uniéndose al σ^{28} impide la transcripción de los mismos. Una vez formados el cuerpo basal y el gancho (la longitud correcta del gancho es uno de los puntos de chequeo), FlgM es secretada por el T3SS con lo que FliA se libera y se transcriben los genes tardíos o Clase III.

- Clase III. Esta última clase está constituida por los genes que codifican la flagelina (*fliC*), genes del estator del motor flagelar (*mot*) y genes de quimiotaxis (*che*). En este punto la especificidad del T3SS cambia para dejar de secretar proteínas de la Clase II

y comenzar la secreción de las proteínas tardías. Primero se secreta la proteína de recubrimiento del filamento FliD, y debajo de ella se van añadiendo monómeros de FliC que van haciendo crecer el filamento (Chevance & Hughes 2008).

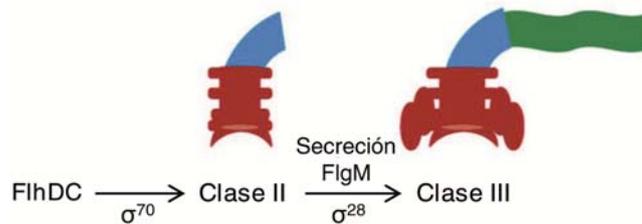


Figura I.4: Esquema de las etapas de biosíntesis del flagelo. Tras el ensamblaje de las proteínas de la Clase II se secreta el factor anti-sigma FliM, permitiendo la expresión de los genes de la Clase III. Imagen adaptada de Anderson *et al.* 2010.

1.2. Estructura y regulación de la maquinaria flagelar en *Sinorhizobium meliloti*.

S. meliloti presenta grandes diferencias con respecto al paradigma de enterobacterias en cuanto a la estructura y a la modulación de la rotación del flagelo. Esta bacteria es una α -proteobacteria perteneciente a la familia *Rhizobiaceae* y al género *Sinorhizobium* (recientemente reclasificado como *Ensifer*) (Lindstrom *et al.* 2010). Se trata de un bacilo Gram-negativo, aerobio, cuyo tamaño oscila entre 0,5 - 1 μm de ancho y 1,2 - 3 μm de largo. Posee flagelos peritricos que rotan en una única dirección a distintas velocidades.

Mientras que los flagelos de bacterias como *E. coli* o *S. enterica* tienen filamentos flexibles que poseen una estructura lisa con leves estrías en su superficie, y que pueden girar tanto en el sentido de las agujas del reloj como al contrario, los de *S. meliloti* exhiben un prominente patrón helicoidal que alterna crestas y surcos, son rígidos y giran únicamente en el sentido de las agujas del reloj. La flexibilidad de los flagelos de enterobacterias les permite responder a los estímulos quimiotácticos cambiando su sentido de rotación. En el caso de las células de *S. meliloti*, al no poder cambiar el sentido de giro, es el control de la velocidad de rotación flagelar lo que les permite orientar el movimiento.

En *E. coli*, los filamentos del flagelo están compuestos por monómeros de un solo tipo de flagelina, mientras que en *S. meliloti*, los filamentos flagelares son complejos y están formados por la unión de cuatro subunidades de flagelina formando heterodímeros. Las subunidades de flagelina (FlaA, FlaB, FlaC y FlaD) se encuentran estrechamente relacionadas y están codificadas por 4 genes ligados que se transcriben de manera independiente. FlaA es la principal flagelina, las otras tres

constituyen las denominadas flagelinas secundarias. Para el ensamblaje de un filamento flagelar funcional es indispensable la presencia de FlaA y al menos una de las proteínas Fla secundarias (Schmitt, 2002; Scharf *et al.* 2001).

Otra diferencia entre *E. coli* y *S. meliloti* radica en el regulador maestro y la organización en clases de algunos de los operones del regulón flagelar (Figura 1.5). Así, mientras en *E. coli* el regulador maestro está codificado por el operón *flhDC*, en *S. meliloti* es un heterómero constituido por dos reguladores transcripcionales de tipo LuxR codificados por el operón *visNR*. En *S. meliloti*, la mayoría de genes implicados en movilidad están organizados en una región del cromosoma de 56 Kb. Al igual que en enterobacterias, en *S. meliloti* la regulación transcripcional de estos genes ocurre de manera jerárquica y están organizados en tres clases principales, pero en el rizobio las Clases I y II tienen subdivisiones.

La Clase IA consta de los genes reguladores maestro *visNR* que codifican el activador transcripcional VisNR. La Clase IB, situada en la cascada por debajo de la Clase IA pero por encima de la Clase II, incluye el gen *rem* (*Regulator of Exponential growth Motility*), que codifica un activador transcripcional de los genes de la Clase II responsable de limitar la expresión de estos genes a la fase exponencial de crecimiento (Rotter *et al.* 2006; Sourjik *et al.* 2000).

Otra diferencia con el paradigma de enterobacterias es la subdivisión de la Clase II en las clases IIA (*orf38* y *fliM*) y IIB (*motA* y *motBC*), dependiendo de si controlan la expresión de genes de la Clase III (*fla* y *che*) o no (Sourjik *et al.* 2000).

En lo que al procesamiento de las señales quimiotácticas se refiere, también hay diferencias entre *E. coli* y *S. meliloti*. En la primera, hasta ahora se han descrito únicamente cuatro receptores quimiotácticos MCP. En cambio, en *S. meliloti* se han identificado hasta nueve genes que codifican este tipo de proteínas (Meier *et al.* 2007). Por otra parte, las enterobacterias poseen un solo regulador de quimiotaxis (CheY) que es fosforilado por CheA y se encarga de interaccionar con el flagelo para modificar el sentido de la rotación. Además poseen una proteína auxiliar (CheZ) con actividad fosfatasa encargada de desfosforilar a CheY y modular su actividad. En *S. meliloti* no existe CheZ, pero sí dos reguladores de respuesta (CheY1 y CheY2) que pueden ser fosforilados por CheA. Por un lado, CheY2 (ortólogo a CheY), es el regulador de respuesta que interacciona con el motor flagelar e incrementa o disminuye su velocidad de rotación. De forma adicional, CheY2 es capaz de llevar a cabo una retrofosforilación vía CheA y acelerar así su desactivación. En cambio, CheY1 actúa como

sumidero de grupos fosfato procedentes de CheA y suple la función de CheZ en enterobacterias (Schmitt 2002).

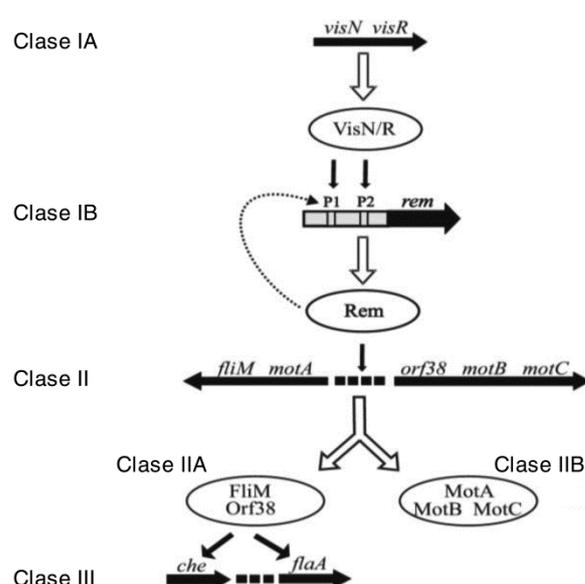


Figura I.5: Esquema de la cascada de expresión del regulón flagelar en *S. meliloti*. Los operones están indicados como flechas horizontales y los correspondientes productos génicos como elipses. Los controles de transcripción positivos se indican con flechas negras verticales y los correspondientes productos génicos con flechas blancas. Se muestran los promotores del gen *rem* (P1 y P2). La flecha punteada indica autorregulación positiva (Rotter *et al.* 2006).

En *S. meliloti*, al igual que en otras bacterias, la expresión de los genes flagelares parece estar sujeta a un estricto control. Así lo han puesto de manifiesto varios análisis de expresión génica global llevados a cabo en *S. meliloti*, donde se ha visto que la respuesta a cambios ambientales como por ejemplo estrés osmótico, pH ácido y hambre de hierro y fosfato, dan lugar a una rápida represión de los genes flagelares y de movilidad (Hellweg *et al.* 2009; Domínguez-Ferreras *et al.* 2006; Chao *et al.* 2005; Krol & Becker, 2004).

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

2. Principales características de la movilidad *swarming*.

Como se ha mencionado, el *swarming* es un movimiento impulsado por flagelos en el que toda una población de bacterias se mueve sobre una superficie. Dada la gran variedad de bacterias que muestran este tipo de movilidad, los requerimientos necesarios y las estrategias empleadas para llevarla a cabo son muy diversos. Sin embargo, se pueden establecer elementos comunes que son necesarios o influyen en

este tipo de desplazamiento. Estos son la densidad poblacional, la forma y estructura de la envuelta celular, la secreción de agentes humectantes o la mecánica flagelar (Partridge & Harshey 2013a; Patrick & Kearns 2012; Kearns 2010; Harshey 2003).

Entre los géneros bacterianos donde se ha identificado el *swarming* encontramos tanto bacterias Gram-negativas como Gram-positivas. En medios de laboratorio el *swarming* se pone de manifiesto variando la composición y la concentración de agar dependiendo de los requerimientos de la bacteria estudiada. Así, podemos diferenciar entre *swarmer* robustos, capaces de desplazarse en medios de diversa composición y con un alto porcentaje de agar (1,5% o superior), y *swarmer* moderados, que muestran un *swarming* altamente dependiente del medio y de la concentración de agar usada (0,4-0,8%) (Partridge & Harshey 2013b; Kearns 2010).

Entre los géneros considerados como *swarmer* robustos están *Azospirillum*, *Rhodospirillum*, *Vibrio* o *Proteus*. En estas bacterias la principal característica del *swarming* es que lleva asociado un proceso de diferenciación que, entre otras cosas, genera cambios drásticos en la morfología celular y da lugar a bacterias alargadas e híper-flageladas (Partridge & Harshey 2013b).

Por su parte, *E. coli* y especies pertenecientes a los géneros de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Salmonella*, *Serratia* o *Yersinia*, son consideradas *swarmer* moderadas. Por lo general, en las bacterias incluidas en este grupo la diferenciación a célula *swarmer* no conlleva alteraciones morfológicas tan significativas. Mientras que en *Bacillus* se incrementa el tamaño de la célula y el número de flagelos (aunque no de forma tan acusada como en un *swarmer* robusto), en las Gram-negativas estos cambios son muy leves o incluso inexistentes (Partridge & Harshey 2013a, 2013b; Kearns 2010).

Como veremos en la siguiente sección, las modificaciones en la estructura celular, independientemente de que sean más o menos pronunciadas, van encaminadas a facilitar, y en muchos casos permitir, la migración de la colonia sobre la superficie. También veremos que, aunque dentro de la definición de *swarming* se incluye la existencia de un proceso de diferenciación, éste muchas veces no está tan claro y varía mucho dependiendo de la especie bacteriana.

2.1. Desafíos del *swarming*.

Para que el *swarming* tenga lugar, las bacterias deben superar una serie de barreras que dificultan, o a veces impiden, el inicio de este tipo de translocación en superficie, y que conlleva una diferente adaptación en función de la especie bacteriana y de las condiciones del medio (Figura I.6) (Partridge & Harshey 2013a).

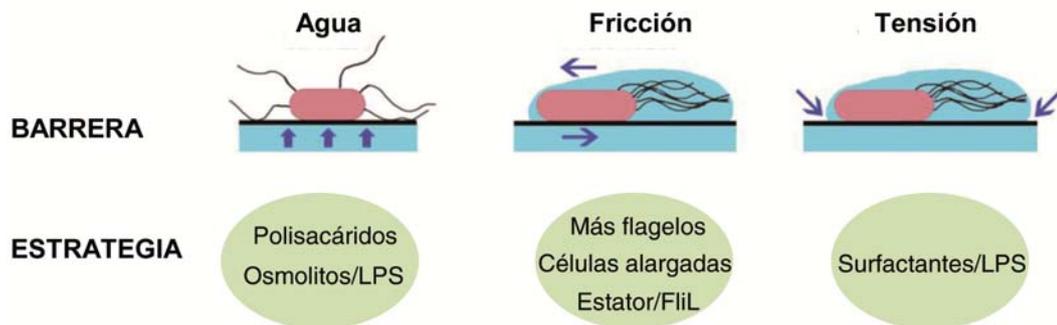


Figura I.6: Principales desafíos para iniciar el movimiento *swarming* y estrategias para superarlos. Imagen adaptada de Partridge & Harshey (2013a).

Al igual que en el *swimming*, durante la movilidad *swarming* se necesita que los flagelos empujen el agua circundante para impulsar a la célula, convirtiéndose ésta en un elemento crítico para este tipo de translocación. En medios semisólidos el agua queda retenida en el agar y no está disponible en la superficie, por lo que el reto más importante para las bacterias es atraer el agua suficiente a la superficie para sumergir completamente las células. Es por esto por lo que en muchas bacterias, especialmente los *swarmer* moderados, se hace necesario mantener las condiciones de humedad adecuadas en las placas de cultivo (Partridge & Harshey 2013a; Kearns, 2010).

Se cree que los polisacáridos y osmolitos de la matriz extracelular secretados por *Proteus mirabilis* pueden servir como agentes para hidratar la colonia. Sin embargo, de acuerdo a los análisis transcriptómicos realizados, en esta bacteria no parece haber una sobre-expresión de genes relacionados con la síntesis de estos compuestos específicamente inducida por el *swarming*. En Gram-negativas como *E. coli*, *Salmonella* o *Pseudomonas*, se ha observado que células *swarmer* sí inducen transcripcionalmente la producción de osmolitos, polisacáridos o lipopolisacáridos (LPS), lo que muestra que para estas bacterias, que son *swarmer* moderados, la hidratación de la colonia es esencial para iniciar el movimiento *swarming*. Además también se ha observado un aumento en la expresión de sistemas de transporte de solutos que pueden ser liberados al medio con el fin de obtener agua. En bacterias deficientes en la producción de estos agentes humectantes se puede suprimir el

defecto en *swarming* añadiendo osmolitos exógenamente. Esto se ha visto, por ejemplo, en mutantes *che* de *S. enterica*, cuyas colonias tienen problemas para hidratarse y problemas de movilidad (Harshey & Partridge 2015; Partridge & Harshey 2013a).

Una vez que disponen de la suficiente cantidad de agua para iniciar la rotación del flagelo, el segundo impedimento que se encuentran las células *swarmer* en el medio es la aparición de fuerzas electrostáticas de fricción que la superficie ejerce contra ellas. La magnitud de esta fuerza depende de las propiedades del material constituyente de la superficie y del grado de lubricación de ésta. Además, el propio movimiento que las bacterias ejercen sobre el fluido que las rodea produce un arrastre viscoso que genera una fricción adicional que dificulta el avance (Partridge & Harshey 2013a).

Una de las estrategias empleadas para minimizar la resistencia del medio es la síntesis de moléculas con propiedades surfactantes que reduzcan las cargas electrostáticas. Ejemplos de este tipo de moléculas son el LPS producido de Gram-negativas, los ramnolípidos y algunos de sus precursores producidos por *Pseudomonas* o los lipopéptidos producidos tanto por Gram-negativas (*Serratia*) como por Gram-positivas (*Bacillus*) (Desai & Banat 1997). Estos compuestos pueden ser totalmente liberados al medio o permanecer asociados a la envuelta celular.

La otra posibilidad para superar las fuerzas de fricción es aumentar la potencia de rotación de los flagelos. Los *swarmer* robustos inducen la síntesis de flagelos más que los moderados; esto les permite moverse por medios más viscosos, es decir, medios con mayor contenido en agar, ya que les proporciona un mayor empuje. Al mismo tiempo estas bacterias incrementan significativamente su longitud; esta adaptación les confiere varias ventajas, como incrementar el área para acomodar mejor a los nuevos flagelos que se están generando, incrementar el paso, minimizar rozamientos o promover la alineación longitudinal de las células (formación de *rafts*) (Turner *et al* 2010). Los *swarmer* moderados, que apenas incrementan la longitud celular y no experimentan hiper-flagelación, mejoran la rotación de los flagelos mediante cambios en el funcionamiento de los estatores que impriman mayor potencia al motor. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* tiene dos estatores (MotAB y MotCD); mientras que para el *swimming* la actividad de cualquiera de ellos es suficiente, para el *swarming* se requiere que funcionen todos de forma combinada (Toutain *et al.* 2005). En cambio, *E. coli* y *Salmonella* sólo tienen dos estatores (MotAB), con lo que en estas bacterias se hace necesario la participación de una proteína adicional (FliL, ver Figura

I.3) que se cree que da soporte a la estructura del flagelo ante la mayor demanda física que impone el medio (Partridge & Harshey 2013a, 2013b).

Por último, tras haberse iniciado el movimiento, la tercera barrera a superar es la tensión superficial del líquido que rodea al frente de avance de la colonia, que se genera debido a la tendencia de las moléculas de agua a unirse entre sí impidiendo la humectación del territorio aún sin colonizar. Este tercer impedimento es superado por las bacterias mediante la producción de surfactantes, siendo dicha producción mediada por *quorum sensing* (Partridge & Harshey 2013a; Daniels *et al.* 2004).

Los surfactantes son moléculas anfipáticas que poseen tanto grupos polares como grupos apolares, por ello, al ir acumulándose en la superficie reducen la tensión superficial entre el sustrato y las células bacterianas facilitando el movimiento de éstas sobre la misma. El requerimiento de surfactantes para el *swarming* varía dependiendo de la especie bacteriana. La mayoría de *swarmer* robustos no requiere este tipo de moléculas. En cambio, la movilidad *swarming* de los moderados, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* o *Rhizobium*, se potencia gracias a los biosurfactantes. Algunas bacterias como *P. aeruginosa* producen varios de estos compuestos, mientras que otras como *Serratia* (serrawetina) o *Bacillus* (surfactina) sólo producen uno (Partridge & Harshey 2013a). Se ha visto que mutaciones que anulan la producción de surfactantes reducen o incluso inhiben completamente el *swarming*, y que éste se restaura tras la aplicación exógena de la molécula purificada. Un ejemplo es *Bacillus subtilis*, en el que la ausencia de surfactina anula la movilidad *swarming*. Este surfactante podría tener una función adicional como molécula señal, induciendo la síntesis de más flagelos (Ghelardi *et al.* 2012).

El hecho de que muchas especies bacterianas muestren este tipo de movilidad y que posean diferentes mecanismos y adaptaciones para superar los impedimentos que la superficie ofrece, demuestra que el *swarming* es un movimiento muy complejo y que constituye una importante forma de invadir territorio en los hábitats naturales bacterianos.

2.2. Señales que desencadenan el *swarming*.

Cuando son transferidas desde un medio líquido hacia una superficie, las bacterias necesitan un periodo de adaptación antes de iniciar el *swarming*, durante el cual no se observan células en movimiento; a esto se le conoce como fase de latencia. Se cree

que dicha fase de latencia puede obedecer a dos fenómenos no excluyentes: (i) la existencia de un mecanismo de percepción de la superficie que desencadena una cascada de transducción de señales para poder elaborar un patrón de respuesta a nivel génico; (ii) la necesidad de alcanzar una densidad celular crítica que permita iniciar el movimiento.

Se acumulan ciertas evidencias que apuntan a que debe existir algún mecanismo de señalización cuya señal efectora sea el contacto con la superficie, de tal manera que durante dicha fase de latencia se activan nuevas rutas de regulación transcripcional y pos-transcripcional que preparan a la colonia para el *swarming*. Dichos mecanismos varían dependiendo de si se trata de *swarmers* robustos, como *Vibrio* o *Proteus*, o *swarmers* moderados, como *E. coli* o *Salmonella*, lo cual se refleja, por ejemplo, en el distinto grado de diferenciación morfológica que muestran unos y otros. A pesar de que se lleva investigando durante muchos años en esta idea, todavía no se conoce cómo se transmite esa señal generada al contacto con la superficie; se cree, y existen ciertas evidencias que lo apuntan, que los flagelos y/o la envuelta celular pueden actuar como sensores mecánicos (Harshey & Partridge 2015; Partridge & Harshey 2013b).

En el caso del flagelo, la señal desencadenante provendría de una reducción en la rotación flagelar a consecuencia del incremento en la viscosidad del medio. Por ejemplo, en *Vibrio parahaemolyticus* tanto la ralentización en la rotación de su flagelo polar como alteraciones en el flujo de iones a través del estator dan lugar a una hiperflagelación. En un medio viscoso se produciría una menor rotación del flagelo y un bloqueo en el flujo de iones a través de la membrana citoplasmática; esto daría lugar al desacoplamiento entre las proteínas del rotor y el estator. Dicho desacoplamiento iniciaría una cascada de señalización que resultaría en la sobre-expresión de genes flagelares laterales. En el caso de los *swarmer* moderados, los cuales se alargan pero no sobre-expresan genes implicados en la síntesis de flagelos, el requerimiento crítico para el *swarming* es la adecuada hidratación de la superficie celular; ésta se consigue gracias a los cambios de sentido de rotación de los flagelos, para los cuales es necesario el sistema de quimiotaxis. Dichos cambios de sentido “despegan” el flagelo atrapado en el medio viscoso permitiendo dos cosas: generar turbulencias que extraen agua hasta la superficie, y liberar LPS al medio, el cual actúa como agente osmótico para favorecer el flujo de agua hacia los flagelos. Se cree que también en este caso los cambios en la interacción rotor-estator serían responsables de iniciar una ruta de señalización que diese lugar, por ejemplo, a un incremento en la síntesis de osmolitos.

Otra hipótesis es que la maquinaria flagelar no actúe como sensor y desencadenante de una ruta de transducción de señales, sino que las responsables de esto sean proteínas situadas en la envuelta celular. Con esta función se ha asociado a sistemas reguladores de dos componentes, los cuales están asociados a la envuelta y controlan la expresión del regulador maestro del regulón flagelar. Un ejemplo es el sistema DegS/DegU de *B. subtilis*, en el que se sabe que DegS es capaz de percibir alteraciones en el estator pero se cree que podría percibir también el contacto con una superficie (Harshey & Partridge 2015; Patrick & Keans 2012).

En cuanto a la densidad celular, se sabe que ésta desempeña un papel clave en *swarming* puesto que para el inicio y el mantenimiento de esta movilidad se requiere que haya un número mínimo de individuos (Verstraeten *et al.* 2008). Este requerimiento induce ya a pensar que la regulación mediada por *quorum sensing* puede jugar un papel importante en el control del *swarming*. La influencia del *quorum sensing* en *swarming* se discutirá en el punto 3 de esta sección.

Además de la superficie y de la densidad celular, se ha demostrado que determinados compuestos químicos presentes en el medio y en la matriz extracelular, pueden funcionar como estímulos para el *swarming*. Esto se pone de manifiesto en el laboratorio en el hecho de que cada especie bacteriana tiene unos requerimientos nutricionales específicos sin los cuales no manifiesta esta movilidad (Partridge & Harshey 2013a; Kearns 2010). Quienes se encargan de detectar estas señales y elaborar una respuesta adecuada suelen ser sistemas de quimiotaxis, sistemas reguladores de dos componentes y/o reguladores citosólicos (Harshey 2003; Fraser & Hughes 1999).

Por ejemplo, *B. subtilis* es capaz de hacer *swarming* en diversos medios ricos energéticamente, mientras que para *S. enterica* o *Yersinia enterocolitica* es necesaria la adición de suplementos particulares como glucosa. Aunque un medio rico puede aportar la energía necesaria para el *swarming*, es común que este tipo de movilidad se vea estimulada ante condiciones nutricionales limitantes (medios mínimos). Por ejemplo *P. aeruginosa* incrementa el *swarming* en condiciones limitantes de nitrógeno y en presencia de determinados aminoácidos (Overhage *et al.* 2008).

En *P. mirabilis*, la putrescina y la glutamina actúan como señales extracelulares que inducen la diferenciación a célula *swarmer*. Normalmente, *P. mirabilis* es incapaz de diferenciarse en medio mínimo pero en presencia de glutamina esta diferenciación sí ocurre (Fraser & Hughes 1999).

Otro elemento implicado en el control del *swarming* es el hierro, el cual es además esencial en las bacterias para el mantenimiento celular. Se ha observado que condiciones de limitación de hierro promueven el *swarming* en algunas bacterias, como *V. parahaemolyticus*, y que el exceso del mismo lo inhibe en otras, como *P. aeruginosa* o *S. meliloti* (Nogales *et al.* 2010; Gode-Potratz *et al.* 2010; Deziel *et al.* 2003). En el caso del hierro, la concentración de dicho elemento en el medio regula la producción de unas moléculas quelantes, denominadas sideróforos, que son secretadas por las bacterias para la captación del mismo, y que se han implicado en la inducción del *swarming*. Así, sideróforos como la pioverdina y la pioquelina (*Pseudomonas* spp.) o la enterobactina (*E. coli*) son necesarios para el *swarming* (Inoue *et al.* 2007; Matilla *et al.* 2007; Banin *et al.* 2005). Se ha demostrado que mutantes de *E. coli*, *Pseudomonas putida* y *S. meliloti* deficientes en distintos sistemas de captación de hierro, son deficientes en *swarming* (Nogales *et al.* 2010; Inoue *et al.* 2007; Matilla *et al.* 2007).

2.3. Diferenciación a célula *swarmer*.

Independientemente de cuál o cuáles sean las señales que disparan el *swarming* en una población bacteriana, la pregunta que surge es si existe un patrón de regulación génica en respuesta a dicha señal específico del *swarming*. Las investigaciones llevadas a cabo tanto con *swarmer* robustos como con *swarmer* moderados muestran que los mecanismos de adaptación a las condiciones inductoras de *swarming* son tan diversos como las bacterias que lo experimentan.

Como ya hemos visto, dos de los rasgos característicos del *swarming* son la hiperflagelación y el alargamiento. En el primer caso se ha observado que existen mecanismos de regulación génica que se ponen en marcha en respuesta a condiciones inductoras de *swarming* (por ejemplo, sobre-expresión de genes flagelares). El alargamiento generalmente se produce como consecuencia de la supresión de la división celular, de tal manera que en ausencia de división las bacterias se alargan formando filamentos multinucleados. Sin embargo, no existen evidencias de que haya un mecanismo de regulación que controle la división celular durante el *swarming*. Además para muchas bacterias el alargamiento y la hiperflagelación no son requisitos indispensables para el *swarming* (Revisado en Kearns (2010).

Los *swarmer* robustos son los que más inducen el alargamiento y la síntesis de muchos flagelos en condiciones inductoras de *swarming*. En *P. mirabilis*, se ha visto que el incremento de la expresión del regulador maestro flagelar *flhDC* es clave en el proceso de diferenciación a célula *swarmer*, ya que integra múltiples señales medioambientales y da lugar a la síntesis de más flagelos y a la expresión de genes implicados en la síntesis de surfactantes y sistemas de regulación por *quorum sensing*. (Fraser & Hughes 1999). También en *V. parahaemolyticus* la expresión de los genes *laf* (flagelos laterales) está controlada por el crecimiento en superficie (Kawagishi *et al.* 1996).

En cambio, otras bacterias no sufren estos cambios estructurales tan llamativos. Los ejemplos más claros los encontramos en bacterias como *Pseudomonas*, *Salmonella* o *Serratia*. Diversos estudios llevados a cabo con estas bacterias han demostrado que su morfología prácticamente no cambia y que el número de flagelos por unidad celular no varía con respecto a células crecidas en condiciones de *swimming*. Esto se ha confirmado mediante análisis transcriptómicos en los que no se ha visto inducción en genes flagelares (Partridge & Harshey 2013b; Takahashi *et al.* 2008; Kearns & Losick 2003).

El *swarming* es un fenotipo complejo ya que, más allá de los cambios morfológicos, lleva aparejados cambios adicionales en la regulación génica. Diversos estudios de expresión génica global y mutagénesis al azar en diferentes bacterias han puesto de manifiesto la gran diversidad a nivel de función de genes implicados en *swarming* y han permitido la identificación de algunos esenciales para dicha motilidad.

Así, en *E. coli* y *P. aeruginosa* se han visto alteraciones sustanciales en rutas metabólicas y en la expresión de genes relacionados con virulencia, secreción, adquisición de hierro, quimiotaxis, biosíntesis de componentes de la superficie celular, reguladores y otros genes de función desconocida, indicando que la diferenciación a célula *swarmer* representa mucho más que un fenotipo asociado a la forma de desplazarse por el medio (Overhage *et al.* 2008; Inoue *et al.* 2007). En *P. aeruginosa* se ha visto que, en general, la población de células localizadas en el borde de la colonia *swarmer* presenta una represión de los genes asociados con virulencia y una activación de los genes implicados en el metabolismo energético. Esto sugiere que estas células, con mayor capacidad para moverse, están “programadas” para llevar a cabo una colonización eficiente de la superficie. Por su parte, las células presentes en el centro de la colonia parecen estar en un estado de vida sésil simulando el estado de células pertenecientes a una biopelícula (Tremblay & Deziel 2010).

También en este caso existen diferencias dependiendo de la bacteria de que se trate. En *S. enterica* no se han observado grandes cambios a nivel de expresión génica entre condiciones inductoras y no inductoras de *swarming* cuando las células crecen sobre una superficie con alta concentración de agar. Sin embargo, sí aparecen diferencias cuando se compara el transcriptoma entre medio líquido y superficie. Esto sugiere que los cambios en el perfil de expresión génica en células *swarmer* de diversas especies bacterianas no atienden tanto a condiciones específicas del *swarming*, sino que se deben más bien al simple hecho de crecer sobre una superficie sólida (Partridge & Harshey 2013b; Kearns 2010).

Aunque se ha mencionado que la inducción de genes flagelares en algunas bacterias no es un requerimiento para el *swarming*, sí se han observado durante el mismo procesos co-regulados con la biosíntesis y ensamblaje de flagelos. En *Pseudomonas syringae* se ha visto que la producción del ácido 3-(3-hidroxi)alcanoiloxi)alcanoico (HAA), que a su vez es uno de los precursores de los ramnolípidos en *P. aeruginosa* y tiene propiedades surfactantes, se regula de forma coordinada con la última etapa de la síntesis flagelar, cuando se codifica la flagelina. Así, mutaciones en genes implicados en el inicio del ensamblaje del flagelo inhiben o reducen la producción de HAA, mientras que mutaciones en genes de la flagelina incrementan la producción de este surfactante, existiendo una regulación coordinada entre el ensamblaje del flagelo y la producción de dicho compuesto (Burch *et al.* 2012).

2.4. *Swarming*, biopelículas y virulencia.

La formación de biopelículas y la movilidad *swarming* son dos fenómenos estrechamente relacionados, ya que ambos son procesos multicelulares asociados al crecimiento sobre la superficie y relacionados con la capacidad infectiva e invasiva de las bacterias, especialmente las patógenas (Verstraeten *et al.* 2008).

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos embebidas en una matriz de exopolisacáridos y fuertemente adheridas a una superficie biótica o abiótica (Verstraeten *et al.* 2008). La formación de una biopelícula ocurre a través de una serie de etapas (Figura 1.7): (i) la primera de ellas comienza con una unión reversible de las células planctónicas libres al entrar en contacto con la superficie; (ii) una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie (ayudada de los flagelos y/o pili tipo IV), comienza a dividirse, las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión

y dan lugar a una microcolonia adherida de forma irreversible; (iii) posteriormente, las bacterias de las microcolonias comienzan a secretar compuestos de distinta naturaleza, como exopolisacáridos (EPS), proteínas, ácidos nucleicos y lípidos, que constituyen la matriz de la biopelícula; (iv) las microcolonias son embebidas en la matriz dando lugar a una biopelícula madura; (v) finalmente, algunas bacterias se liberan de la matriz de la biopelícula y colonizan nuevas superficies comenzando de nuevo el proceso (McDougald *et al.* 2012).

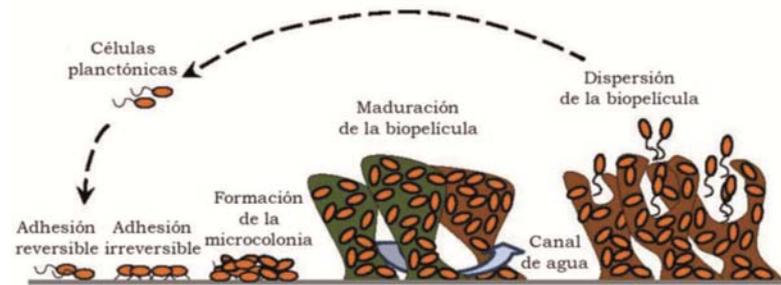


Figura I.7: Representación esquemática de las principales etapas en la formación de una biopelícula bacteriana. Imagen tomada de Amaya-Gómez (2013).

La matriz extracelular desempeña varias funciones. Por un lado actúa de soporte y estabilizador para las células embebidas en ella y es una fuente de energía, ya que en la matriz se acumulan enzimas líticas que liberan nutrientes a partir de las macromoléculas que la constituyen. Por otro lado, la matriz proporciona un escudo protector frente a toxinas, agentes antimicrobianos o predadores. Cuando la biopelícula ha alcanzado un determinado tamaño, comienza una fuerte competencia dentro de ésta por los nutrientes y/o el espacio, activándose el proceso de dispersión durante el cual las células planctónicas salen de esta comunidad (Waters 2013; McDougald *et al.* 2012).

Durante su ciclo de vida, las bacterias pueden encontrarse con diferentes situaciones que las hacen tener que escoger entre vivir en un estado de vida libre planctónico, desplazándose de forma coordinada con otras bacterias, o permanecer en estado de vida sésil formando biopelículas. Dichas situaciones implican cambios en las condiciones ambientales y de crecimiento, de forma que existen determinadas señales químicas que desencadenan la transición entre un modo de vida u otro. Por lo tanto, muchas de las señales que influyen en la movilidad *swarming* (percepción de la superficie, estado nutricional, presencia de determinados compuestos químicos disueltos en el medio o formando parte de la envuelta celular, señales de *quorum sensing*...) influyen también en la formación de biopelículas. Al igual que ocurre con el

swarming, cada una de estas señales va a afectar de manera distinta el comportamiento de las bacterias en el biofilm dependiendo de la especie de que se trate. Del mismo modo, existen mecanismos de regulación que controlan de forma coordinada ambos procesos y en los que están implicados elementos comunes.

Diferentes especies de *Pseudomonas* inducen la dispersión del biofilm en respuesta a determinadas condiciones nutricionales, pero con ciertas diferencias entre ellas. Mientras que *P. putida* y *P. fluorescens* rápidamente se dispersan ante la caída en los niveles de carbono, *P. aeruginosa* lo hace cuando el carbono disponible aumenta. También el nivel de oxígeno en la biopelícula influye. Por ejemplo, *Shewanella oneidensis* y *P. aeruginosa* deshacen el biofilm en respuesta a la bajada en la tensión de oxígeno.

Precisamente se ha visto que en *P. aeruginosa*, bajas concentraciones de oxígeno resultan en la sobre-expresión de genes relacionados con *swarming* y biosíntesis de ramnolípidos, mientras que los genes necesarios para la síntesis de EPS son reprimidos (An *et al.* 2010). Además, en diferentes bacterias como *V. parahaemolyticus*, *S. enterica* o *P. aeruginosa*, se han identificado sistemas reguladores que responden a estímulos ambientales y que regulan de manera inversa *swarming* y formación de biopelículas; alteraciones en la expresión de algunos de los componentes de dichos sistemas resultan en una mayor tendencia a la adhesión y menor capacidad de desplazamiento en superficies y viceversa (revisado en Verstraeten *et al.* 2008).

Aunque se han mencionado sólo algunos ejemplos, las rutas de señalización y los estímulos que las inducen son muy variados. Además, en muchas ocasiones es complicado establecer un patrón de regulación génica concreta dentro de un biofilm dada la heterogeneidad en el estado fisiológico de las células. Lo que sí parece claro es el papel central del segundo mensajero diguanilato cíclico (di-GMPc) en el control de la transición entre biofilm y célula *swarmer*. Los niveles intracelulares de esta molécula, en cuyo balance confluyen la mayoría de rutas de señalización desencadenadas tras la percepción de señales inductoras/represoras de la motilidad, rigen si una población bacteriana permanece en estado sésil o si comienza a desplazarse; así, bajas concentraciones de di-GMPc inducen la dispersión celular, mientras que niveles altos del mensajero reprimen rutas relacionadas con movilidad y activan otras encaminadas a la síntesis de la matriz y al establecimiento sobre la superficie. Quienes regulan dichos niveles son diguanilato ciclasas (síntesis) y

fosfodiesterasas (degradación), las cuales son proteínas diana de las rutas de señalización mencionadas anteriormente, siendo activadas o moduladas por ellas (McDougald *et al.* 2012; Schirmer & Jenal 2009; Verstraeten *et al.* 2008).

Otros elementos cruciales tanto para el *swarming* como para la formación de biopelículas son los flagelos y la envuelta celular, en la cual se incluyen los polímeros extracelulares y los surfactantes producidos por las bacterias.

Aunque los flagelos son motores para el desplazamiento, y por tanto están más relacionados con procesos de dispersión, se necesitan en las primeras etapas de la formación de la biopelícula, ya que controlan el anclaje de las células al sustrato en dichas etapas, permitiendo o no el desarrollo de microcolonias (Hirsch *et al.* 2009; Shrout *et al.* 2006).

Con respecto a los surfactantes, en algunas bacterias mutaciones en la producción de estos compuestos dan lugar a reducción en *swarming* e incremento del biofilm, mientras que en otras la deficiencia en su síntesis genera alteraciones en la estructura del biofilm. Por ejemplo, mutantes de *P. aeruginosa* afectados en la síntesis de ramnolípidos no forman las microcolonias características de las fases iniciales del desarrollo de la biopelícula, dando lugar a estructuras planas poco desarrolladas. (Pamp & Tolker-Nielsen 2007). Esto puede deberse a que la carencia de ramnolípidos afecte al *swarming*, y por ende a la acción de los flagelos y su efecto positivo en el comienzo de la formación de la biopelícula. Por el contrario, en *S. enterica* la surfactina inhibe la formación de biofilm al mismo tiempo que estimula el *swarming* (Mireles *et al.* 2001).

Finalmente, uno de los fenotipos más importantes asociados al *swarming* y la habilidad de establecer biofilms es la capacidad de virulencia. Tanto uno como otro protegen a las bacterias de agentes antimicrobianos, como los antibióticos o determinadas toxinas, haciendo a las bacterias patógenas más resistentes frente a las defensas del organismo hospedador. Pero además, la diferenciación a célula *swarmer* en muchas ocasiones va acompañada de la expresión de factores de virulencia (McDougald *et al.* 2012; Verstraeten *et al.* 2008).

Proteínas de virulencia como ureasas, metaloproteasas o hemolisinas están sobre-expresadas en células *swarmer* de *P. mirabilis*. En esta bacteria se ha visto que la expresión de genes de virulencia se co-regula con la de genes flagelares (Belas & Suvanasuthi 2005). En *S. enterica* el patrón de expresión inducido por el estado *swarming* incluye la mayor expresión de la isla de patogenicidad SPI-1. Además esta bacteria muestra una mayor resistencia a antibióticos (Wang *et al.* 2004). Factores de

virulencia muy importantes para *P. aeruginosa* como son el sistema de secreción tipo III y sus efectores, proteasas extracelulares o sistemas de adquisición de hierro, están inducidos en células *swarmer* (Overhage *et al.* 2008). Además se ha visto que ciertos reguladores ejercen un efecto positivo sobre el *swarming* y la expresión de genes de virulencia y al mismo tiempo afectan negativamente al establecimiento de biopelículas (Verstraeten *et al.* 2008).

3. Señales químicas que controlan el *swarming* y la formación de biopelículas en bacterias.

3.1. Señales de *quorum sensing*.

La densidad celular es un factor central en la movilidad *swarming*, ya que para iniciar y sostener el movimiento se necesita una masa celular crítica. Por otra parte, las bacterias embebidas dentro de la matriz de una biopelícula están más expuestas al contacto con los productos provenientes de la actividad metabólica de las células situadas en la vecindad. No es de extrañar por tanto que en muchas bacterias tanto la movilidad *swarming* como la formación de biopelículas estén influenciadas por la regulación por *quorum sensing*.

El *quorum sensing* (QS) consiste en un proceso de comunicación que permite a las bacterias controlar la expresión génica en respuesta a cambios en la densidad de la población, alterando comportamientos colectivos que son cruciales para la supervivencia y el desarrollo de las mismas en el medioambiente. Este proceso regulador implica la producción, liberación y detección de una serie de moléculas de distinta naturaleza química, capaces de difundir de forma más o menos pasiva a través de la envuelta celular y por el medio extracelular, conocidas como autoinductores (AI del inglés *AutoInducer*).

El modo básico de funcionamiento de los sistemas de QS se puede establecer en tres pasos: (i) primero tiene lugar la síntesis intracelular del AI, llevada a cabo generalmente por una única proteína; (ii) seguidamente se produce la difusión libre del mismo a través de las envueltas celulares, de forma que dichas moléculas se van acumulando en el ambiente extra e intracelular a medida que aumenta la densidad de la población; (iii) finalmente, y tras superarse un umbral crítico en el que se considera

que la población ha alcanzado el *quorum*, se produce el reconocimiento del AI por parte de un regulador específico, lo que desencadena una cascada de transducción de señales que termina en la generación de cambios en la expresión génica global de la población (Ng & Bassler 2009). Entre los genes controlados por el regulador de QS, está el gen codificante de la sintasa, de tal forma que la percepción de la señal QS induce mayor producción de la misma, de ahí que se conozca a estos compuestos como autoinductores.

Desde el punto de vista químico, existe una gran variedad de moléculas que actúan como señales de QS: péptidos en bacterias Gram-positivas, el autoinductor AI-2 (diéster furanosil borato), moléculas de naturaleza lipídica, etc (Papenfort & Bassler 2016; Galloway *et al.* 2011). Por su mayor relación con la temática de esta Tesis Doctoral, nos centraremos en describir algunos ejemplos de señales de QS de naturaleza lipídica (Figura 1.8) y su participación en el control de la movilidad en superficie y la formación de biopelículas en bacterias.

3.1.1. Acil-homoserina lactonas

Las moléculas de QS más ampliamente distribuidas y que más se han estudiado son las acil-homoserina lactonas (AHL), que son moléculas señal de naturaleza lipídica empleadas por las bacterias Gram-negativas. Estas moléculas tienen una estructura común basada en un anillo de homoserina lactona unido por un enlace amida a un grupo acilo de longitud variable (de 4 a 18 átomos de carbono). Esta cadena de acilo puede presentar distinto grado de insaturación así como también contener diferentes sustituyentes en el C3 (grupos carbonilo, 3-oxo; grupos hidroxilo, 3-hidroxi) (Figura 1.8a). Esta estructura química le confiere a las AHL naturaleza anfipática, permitiéndoles difundir a través de las membranas celulares (Galloway *et al.* 2011). Las AHL participan en el control coordinado de una gran variedad de comportamientos bacterianos dependientes de densidad celular, tales como motilidad, formación de biofilm, síntesis de factores de virulencia, emisión de bioluminiscencia o nodulación. (Galloway *et al.* 2011).

La principal diana durante el *swarming* de los sistemas QS-AHL es la regulación de la producción de biosurfactantes.

En *P. aeruginosa* y *Serratia* spp., la producción de ramnolípidos y serrawetina, moléculas clave para el *swarming* por su actividad surfactante como ya se ha visto,

está controlada por AHL. La mutación en el gen que codifica la sintasa de AHL *swrI* de *Serratia liquefaciens* abole la movilidad *swarming*, la cual se recupera tras la inducción de la síntesis de serrawetina por la adición exógena de AHL (Daniels *et al.* 2004). Algo similar ocurre con el sistema QS *cep* de *Burkholderia cepacia*, el cual participa en el control del *swarming* a través de la regulación de la síntesis de un compuesto biosurfactante. Además este sistema es necesario para la maduración del biofilm en dicha bacteria (Huber *et al.* 2001).

El regulador global GacA/GacS de *Pseudomonas* spp. es un sistema de dos componentes que controla la expresión del sistema QS *rhIR* en respuesta a una señal ambiental aún no identificada. La mutación de cualquiera de los dos componentes afecta negativamente a la síntesis de AHL y elimina el *swarming* en *Pseudomonas syringae* sin afectar a la movilidad *swimming*. Curiosamente, mientras que un mutante de esta bacteria defectivo en la síntesis de AHL muestra un fenotipo *swarming* positivo, la adición de AHL exógenas en mutantes en *gacA* o *gacS* sólo restaura levemente esta movilidad (Daniels *et al.* 2004).

Las AHL de cadena larga sintetizadas por *Rhizobium etli* tienen un doble papel en *swarming* (Daniels *et al.* 2006). Por un lado, el sistema de QS *cinIR* implicado en la síntesis y percepción de dichas moléculas es esencial para la movilidad *swarming*, ya que mutantes *cin⁻* pierden la capacidad de desplazarse en superficie. Por otra parte, el proceso de autorregulación que se desencadena una vez que se alcanza el *quorum* induce mayor producción de AHL, las cuales tienen un papel directo en la movilidad ya que actúan como surfactantes promoviendo el desplazamiento en superficie.

Curiosamente, la adición de AHL de cadena larga ejerce un efecto antagónico en la translocación en superficie de *Serratia marcescens* SS-1, la cual está mediada en condiciones normales por la producción de serrawetina (Horng *et al.* 2002).

Además de controlar aspectos relacionados con el *swarming*, motilidad asociada con los procesos de iniciación y dispersión de las biopelículas, los sistemas de QS-AHL también participan en las fases intermedias de maduración del biofilm. Además del ejemplo anterior de *B. cepacia*, esto se ha visto en *P. aeruginosa*, en la que la activación y represión coordinada de los sistemas *las/rhl* determinan la transición entre distintas sub-etapas durante la maduración del biofilm (Donlan 2002).

Por su parte, la bacteria de la rizosfera *P. fluorescens* 2P24 requiere de la participación de las AHL para la formación del biofilm, lo cual repercute en su actividad como agente de biocontrol. De forma similar, mutantes en el sistema QS Esal/Esar del patógeno vascular *Pantoea stewartii* manifiestan un fenotipo aberrante en el

desarrollo de la estructura tridimensional del biofilm, y además muestran mayor deficiencia en la diseminación dentro del xilema, lo cual causa alteraciones en el transcurso de la enfermedad (revisado en Danhorn & Fuqua 2007).

Existen diversos reguladores (proteínas tipo LuxR, ARN de pequeño tamaño, etc) que alteran la síntesis de AHL mediante la regulación de la expresión de su correspondiente sintasa. Por otro lado, lactonasas sintetizadas por diversas especies del género *Bacillus*, así como aminoacilasas producidas por *Ralstonia* o *Vibrio paradoxus* tienen la capacidad de inactivar los sistemas de QS a través de la rotura de las correspondientes AHL, proceso que recibe el nombre de *quorum quenching* (Daniels *et al.* 2004).

Curiosamente, se ha descrito la síntesis de compuestos análogos a AHL (AHL-*mimics*) por parte de plantas que alteran la movilidad, la formación de biofilm y la expresión génica en bacterias que cohabitan con ellas en la rizosfera. Se cree que estos compuestos, por lo general estimuladores del *swarming*, impiden a las bacterias concentrarse en un número suficiente para llevar a cabo la adhesión y la colonización de los tejidos del hospedador. Por ejemplo, exudados de las raíces de guisante inducen la movilidad *swarming* de *S. liquefaciens* a través de la activación de la síntesis de serrawetina (Teplitski *et al.* 2000). También se ha visto que extractos de *Medicago truncatula*, además de estimular el *swarming* en esta bacteria, dificultan el establecimiento de biopelículas (Teplitski *et al.* 2000). En otros casos, compuestos secretados por las plantas interfieren con la regulación QS e inducen la formación de biofilm y la expresión de factores de virulencia. Un ejemplo es el ácido rosmarínico, al que se le atribuye un papel defensivo al inducir prematuramente la respuesta QS de la bacteria (Corral-Lugo *et al.* 2016).

3.1.2. Ácidos grasos (familia DSF)

Algunas bacterias Gram-negativas, entre las que se encuentran muchas bacterias fitopatógenas, así como también patógenos oportunistas de animales, emplean ácidos grasos en los procesos de señalización célula-célula. Este tipo de moléculas, consideradas como una clase única dentro de las señales QS, están implicadas en procesos de comunicación intra e inter-específicos, e incluso en comunicación bacteria-organismo eucariota, y regulan importantes fenotipos bacterianos como el crecimiento, la virulencia, la resistencia a antibióticos, la motilidad, la formación de

biopelículas, la síntesis de polímeros o la persistencia en el medio (Zhou *et al.* 2017; Soto *et al.* 2017).

La familia de moléculas señal conocida como DSF (del inglés *Diffusible Signal Factor*) son ácidos grasos de longitud de cadena variable y diferente grado de ramificación, caracterizados por poseer una insaturación en *cis* en la segunda posición de la cadena, la cual es clave para la actividad biológica de estas moléculas (Ryan *et al.* 2015) (Figura 1.8b). El ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenoico, sintetizado por el patógeno vegetal *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc) es el paradigma dentro de esta familia de moléculas señal, sin embargo la producción de moléculas DSF se extiende a otras bacterias como *B. cepacia* (ácido *cis*-2-dodecenoico o BDSF), *P. aeruginosa* (ácido *cis*-2-decenoico), *Xylella fastidiosa* (ácido *cis*-2-tetradecenoico o XfDSF1 y *cis*-2-hexadecenoico o XfDSF2), y *Xanthomonas oryzae* (ácido 11-metildodeca-*cis*,*cis*-2,5-dienoico o CDSF). Estas bacterias, con la excepción de *P. aeruginosa*, sintetizan más de un tipo de molécula DSF, aunque cada género produce y responde a una mayoría (Zhou *et al.* 2017). Curiosamente, sólo tienen una enzima encargada de la síntesis de estos compuestos (RpfF) (Zhou *et al.* 2015).

En muchas bacterias la señalización mediada por moléculas DSF incrementa la producción de enzimas extracelulares y polisacáridos y estimula la formación de biopelículas y la tolerancia frente a antibióticos, contribuyendo de esta forma a la virulencia de estas bacterias. Además, se ha implicado a la familia DSF en señalización inter-específica y entre reinos, afectando a comportamientos de otros microorganismos que no producen dichas moléculas (Zhou *et al.* 2017).

Por ejemplo, *P. aeruginosa* es capaz de responder a señales DSF de su entorno no sintetizadas por ella, lo que le lleva a incrementar la formación de biofilm o su resistencia frente a polimixina, y en último término a una mayor persistencia en ratón. Por el contrario, en otras bacterias como *Bacillus*, *Staphylococcus*, y *E. coli*, la percepción de moléculas DSF conlleva la inhibición del biofilm y el aumento en la susceptibilidad a los antibióticos (Soto *et al.* 2017). Recientemente, se ha visto que la señal BDSF de *Burkholderia* spp. causa la dispersión del biofilm, el aumento en la producción de la alarmona guanósina tetrafosfato (ppGpp), y la sobre-expresión de sistemas de captación de hierro a través de la inducción de la síntesis de sideróforos en *Francisella novicida* (muy próxima al patógeno de mamíferos *F. tularensis*) (Zhou *et al.* 2017).

Finalmente, se ha implicado a la familia DSF con procesos de señalización entre organismos de distintos reinos. Los compuestos DSF, BDSF y CDSF actúan para prevenir la transición de la forma de levadura a la forma filamentosa del hongo patógeno *Candida albicans*. Más recientemente se ha visto que moléculas DSF producidas por *Xcc* inducen respuesta de defensa en las plantas, aumentando la deposición de calosa, la muerte celular e induciendo los genes de defensa PR1 (Kakkar *et al.* 2015). Además, la expresión ectópica de la sintasa RpfF de *X. fastidiosa* en cítricos ha resultado en una reducción en la virulencia de *Xanthomonas citri* y en los síntomas de la enfermedad (Caserta *et al.* 2014).

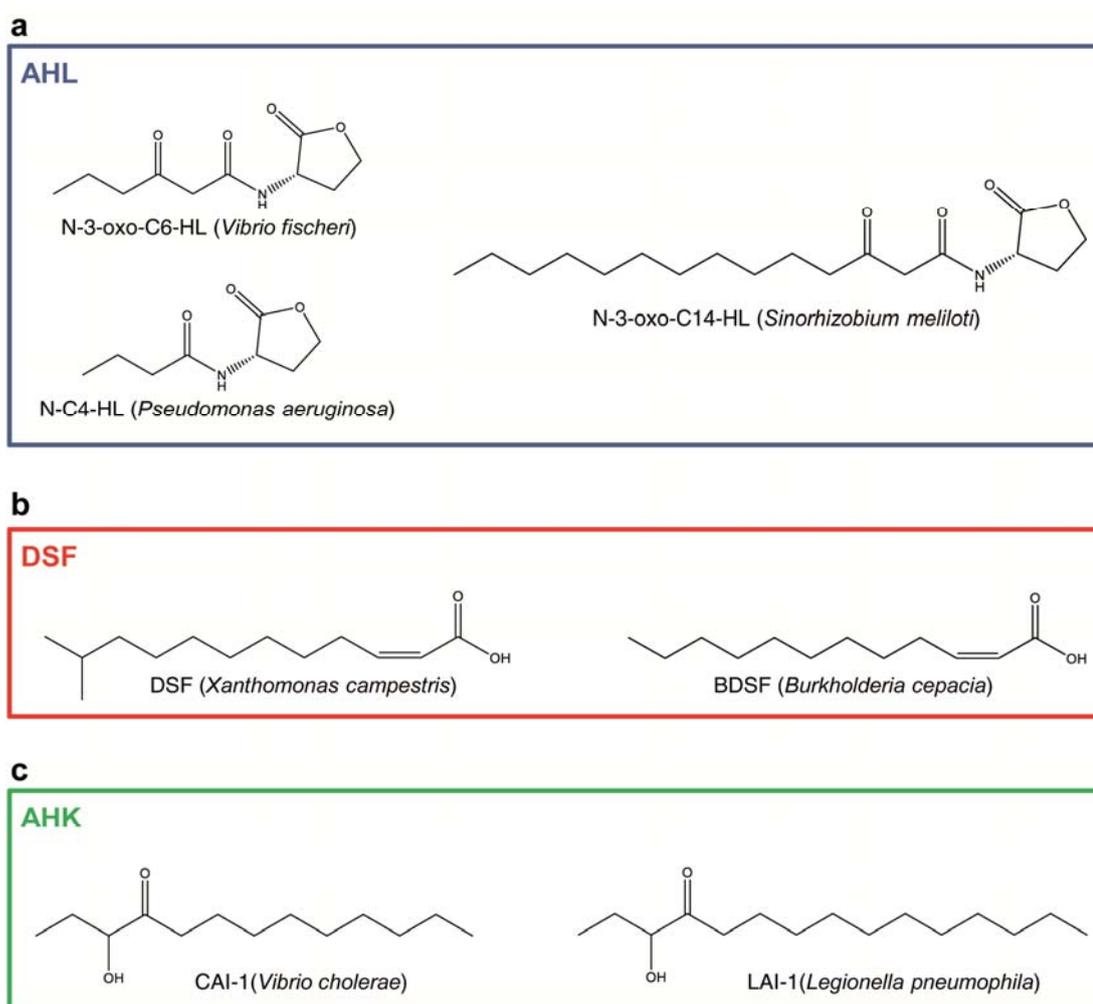


Figura 1.8: Ejemplos de la estructura química de algunos miembros representativos de tres de las principales familias de moléculas señal de QS de naturaleza lipídica: **(a)** acil-homoserina lactonas (AHL), **(b)** ácidos grasos (familia DSF), y **(c)** α -hidroxicetonas (AHK).

3.1.3. Familia de las α -hidroxicetonas

Las α -hidroxicetonas (AHK) son un grupo de moléculas señal de QS producidas y percibidas por un grupo de gamma-proteobacterias acuáticas entre las que se encuentran los patógenos oportunistas causantes del cólera y neumonía *Vibrio cholerae* y *Legionella pneumophila*, respectivamente. La primera molécula que fue identificada y la que representa a esta familia es la 3-hidroxitridecano-4-ona o CAI-1 (del inglés, *Cholera Autoinducer-1*). Por su parte, *Legionella pneumophila* sintetiza la 3-hidroxi-pentadecano-4-ona o LAI-1 (del inglés, *Legionella Autoinducer-1*) (Soto *et al.* 2017; Tiaden *et al.* 2010) (Figura 1.8c).

Ambas, son moléculas de naturaleza volátil capaces de difundir a través del aire. Se trata de cetonas alifáticas que tienen el grupo carbonilo en posición 4 y pueden presentar distinta longitud de cadena y variaciones en los carbonos 2 y 3; el C3 puede contener un grupo hidroxilo o un grupo amino, y el enlace entre los carbonos C2 y C3 puede ser saturado o insaturado (Tiaden *et al.* 2010).

Las AHK regulan importantes fenotipos en *Vibrio* y en *Legionella* incluyendo virulencia, formación de biofilm, interacciones con células eucariotas, la expresión de una región genómica llamada “*fitness island*” y la competencia por la captación de ADN (Tiaden & Hilbi 2012).

A baja densidad celular, *V. cholerae* activa la expresión de factores de virulencia y forma biopelículas. A alta densidad celular, la acumulación de CAI-1 reprime la producción del factor de virulencia TCP (del inglés, *Toxin Co-regulated Pilus*), al mismo tiempo que estimula la motilidad y la competencia (Ng & Bassler 2009). Mutantes en el sistema QS (*lqs*) de *Legionella* están severamente afectados en su capacidad para penetrar en su célula hospedadora y replicarse en su interior, presentan defectos en motilidad y muestran mayor capacidad para la adquisición de ADN exógeno (Tiaden & Hilbi 2012).

Por lo tanto CAI-1 y LAI-1 son moléculas señal que regulan las dos formas de vida que exhiben estas bacterias participando en la transición entre el modo de vida libre y un modo de vida dentro del nicho de las células hospedadoras. Recientemente se ha visto que LAI-1 está implicada en procesos de comunicación entre la bacteria y las células eucariotas, modulando la migración del patógeno a través de éstas (Tiaden & Hilbi 2012).

3.2. Compuestos volátiles.

Además de las señales canónicas descritas anteriormente, las bacterias producen una gran variedad de compuestos de bajo peso molecular (<300 Da) y con alta presión de vapor (0,01 kPa a 20 °C) capaces de evaporarse y difundir fácilmente a través de ambientes sólidos, líquidos, o gaseosos y que pueden tener impacto en diversos aspectos de la biología de las mismas. A estos compuestos se les denomina comúnmente como BVC (del inglés, *Bacterial Volatile Compounds*). Hasta ahora se han descrito más de 1000 BVC, pero teniendo en cuenta la gran diversidad de nichos en donde pueden encontrarse viviendo las bacterias, se piensa que esta cifra puede estar muy por debajo del número real de compuestos volátiles producidos.

Las bacterias sintetizan una gran variedad de volátiles tanto orgánicos como inorgánicos, entre los que se encuentran hidrocarburos, cetonas y alcoholes, ácidos, terpenos, compuestos sulfurados o compuestos volátiles que contienen nitrógeno (Audrain *et al.* 2015a, 2015b).

A diferencia de las señales QS, las rutas de síntesis y de señalización de estos compuestos no están bien definidas en muchos casos. Salvo los terpenoides, los BVC de origen orgánico suelen producirse a partir de intermediarios de las rutas de biosíntesis y degradación de ácidos grasos a través de diferentes reacciones químicas. Por ejemplo, alcanos, 1-alquenos o metilcetonas, suelen originarse a partir de la descarboxilación de los ácidos grasos, lo que da lugar a una reducción de la polaridad y la solubilidad en agua (Yu *et al.* 2014).

Por lo general, cetonas y alcoholes son los derivados más frecuentes. Las metilcetonas suelen tener un número impar de átomos de carbono en su cadena alifática ya que provienen de la descarboxilación de intermediarios β -ceto ácidos con un número par de carbonos; aunque existen, es muy raro encontrar ácidos grasos con un número impar de átomos de carbono, por lo tanto las metilcetonas con número par en su cadena alifática, aunque existen, son raras en la naturaleza. Por su parte, los alcoholes alifáticos de cadena larga, tales como 1-octanol, 1-decanol, o 1-dodecanol, se producen a partir de derivados de las rutas de α - y β -oxidación de los ácidos grasos (Soto *et al.* 2017).

Las investigaciones llevadas a cabo con este tipo de compuestos han revelado el importante papel de los BVC en interacciones microbianas dentro de distintos ambientes incluyendo el suelo, la microbiota animal y vegetal y los biofilms. Estos compuestos afectan el desarrollo, la resistencia frente a agentes microbianos, la

capacidad de desplazarse o de formar biopelículas, o a la virulencia de una gran diversidad de bacterias. Además, se ha visto que los BVC pueden influir no sólo en determinados fenotipos bacterianos, sino también en el crecimiento, la diferenciación, la resistencia a estreses, y el comportamiento de hongos, plantas e invertebrados (Audrain *et al.* 2015a; Effmert *et al.* 2012; Kai *et al.* 2009).

Estudios recientes han demostrado la influencia de los BVC en la movilidad y en las distintas etapas del desarrollo de las biopelículas bacterianas.

La exposición de *E. coli* y *P. aeruginosa* a los volátiles no tóxicos 1-butanol e indol, respectivamente, reduce la capacidad de estas bacterias para desplazarse, mientras que la 2-butanona y la 3-hidroxibutanona (acetoína) producen el efecto contrario (Letoffe *et al.* 2014). Por otro lado el *swarming* de *E. coli*, *Burkholderia glumae*, *P. aeruginosa* y *Paenobacillus polymyxa* se ve negativamente afectado por compuestos volátiles emitidos por la bacteria Gram-positiva *B. subtilis* (Kim *et al.* 2013). En el caso concreto de *E. coli*, esta reducción en la motilidad se correlaciona con la bajada en la expresión de genes flagelares y de quimiotaxis. También se ha visto que el ácido glioxílico reduce el movimiento *swarming* en *E. coli* (Kim *et al.* 2013).

Otros BVC son capaces de influir en la habilidad de las bacterias para desarrollar comunidades adheridas a superficie. Por ejemplo, el amonio induce biofilm en *Bacillus licheniformis*, *B. subtilis* y *Staphylococcus aureus* (Letoffe *et al.* 2014). Se ha visto que algunos compuestos pueden tener efectos distintos dependiendo de la especie bacteriana. Por ejemplo, se ha visto que el indol en su forma soluble incrementa la formación de biofilm en diversas bacterias como *V. cholerae*, *P. fluorescens* o *P. aeruginosa*, mientras que aplicado como volátil estimula la formación de biopelículas en *S. aureus* pero la disminuye en *E. coli* y *P. aeruginosa*. Algunos otros BVC (1-butanol, 2-butanona, acetoína, amonio, etanol, hexadecano, ácido glioxílico o las metilcetonas 2-butanona, 2-heptanona, 2-nonanona y 2-undecanona, entre otros) influyen positiva o negativamente y en mayor o menor grado en una o varias especies bacterianas, incluyendo *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis* (Audrain *et al.* 2015b; Letoffe *et al.* 2014). Recientemente se ha demostrado que el aldehído pentadecanal producido por la bacteria *Pseudoalteromonas haloplanktis* inhibe la formación de biofilms de *Staphylococcus epidermidis* (Casillo *et al.* 2017). El estudio del mecanismo de acción ha revelado que funciona como la señal de QS AI-2, por lo que probablemente interfiera con el sistema QS de *S. epidermidis*.

Una de las etapas que comprende el ciclo de formación de las biopelículas incluye los eventos de dispersión que permiten a las bacterias volver al estado de vida

planctónico. Algunos compuestos volátiles, como el óxido nítrico (NO), puede disparar dicho proceso de dispersión tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas. La adición de NO a bajas concentraciones dispersa el biofilm formado por *P.aeruginosa*, *E. coli*, *V. cholerae*, *B. licheniformis*, *S. marcescens* o *Fusobacterium nucleatum*, entre otros (Barraud *et al.* 2009), y se ha visto que este efecto en dispersión puede estar mediado por el segundo mensajero di-GMPc (Audrain *et al.* 2015b; McDougald *et al.* 2012).

4. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

Determinadas bacterias del suelo, conocidas comúnmente como *Rhizobium* o rizobios, son capaces de establecer simbiosis mutualista con plantas leguminosas. Los rizobios constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos Gram-negativos, móviles no esporulados, que pueden llevar a cabo la transición entre un modo de vida libre en el suelo y el modo de vida en simbiosis. Dicha simbiosis se caracteriza por la aparición de un nuevo órgano especializado en la raíz (o en algunos casos el tallo) de la leguminosa, el nódulo, que será ocupado por la bacteria la cual, tras un proceso de diferenciación, llevará a cabo la fijación biológica del nitrógeno (FBN). Dicho proceso consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio. De esta manera, se establece una relación mutualista en la que la bacteria proporciona a la planta una fuente combinada de nitrógeno, mientras la planta proporciona a la bacteria una fuente de carbono procedente del fotosintato (Oldroyd 2013; Oldroyd *et al.* 2011).

Esta simbiosis tiene gran importancia ecológica y agronómica. Por un lado, el nitrógeno es uno de los elementos esenciales para los organismos vivos, además de ser el elemento más abundante en la atmósfera, y, sin embargo, también es el más limitante. Esto se debe a que su estructura más habitual, la bimolecular (N_2), es una forma no asimilable por la mayoría de organismos vivos. Así, se hace necesaria la conversión del N_2 a una forma capaz de ser metabolizada. Por otro lado, gracias a la FBN las plantas leguminosas, que constituyen uno de los cultivos con mayor importancia económica para el hombre, adquieren la ventaja de poder crecer en suelos pobres en nitrógeno sin necesidad de añadir fertilizantes químicos, permitiendo el desarrollo de una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente.

Además de ser importante a nivel ecológico y agronómico, la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa representa un modelo de investigación básico para profundizar en el

conocimiento de procesos de regulación génica y reconocimiento interespecífico. Además, los rizobios están relacionados filogenéticamente con numerosos microorganismos patógenos, tanto de plantas como de animales, y se acumulan numerosas evidencias que sugieren la utilización de mecanismos similares por parte de ambos tipos de bacterias para la invasión de hospedadores eucariotas (Zipfel & Oldroyd 2017; Gourion *et al.* 2015; Oldroyd 2013; Soto *et al.* 2009; Soto *et al.* 2006). Por ello, el estudio de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa puede ser útil a la hora de descifrar las bases moleculares de las interacciones planta-bacteria.

Para que la simbiosis tenga lugar de forma efectiva han de transcurrir tres eventos: i) infección intracelular de las células de la planta por parte del microsimbionte, ii) desarrollo y organogénesis del nódulo y iii) el proceso de fijación del nitrógeno atmosférico. El primer y el segundo evento ocurren simultáneamente, mientras que la fijación ocurre después de que la organogénesis está completada y sólo si la infección bacteriana es la adecuada (Oldroyd *et al.* 2011).

El nódulo proporciona el entorno adecuado para que se produzca la FBN. Tanto la organogénesis como la infección bacteriana son dos procesos totalmente distintos y genéticamente separados. Sin embargo, para que la formación del nódulo tenga lugar en el sitio donde se ha producido la infección, ambos procesos deben ser coordinados tanto espacial como temporalmente (Oldroyd *et al.* 2011; Jones *et al.* 2007). En ese sentido, el desarrollo del nódulo es un proceso que requiere del intercambio de señales entre la bacteria y la planta hospedadora, estableciéndose un verdadero diálogo molecular entre ellos y cuyo fin es el establecimiento de nuevos patrones morfogénicos en ambos organismos.

Los rizobios son capaces de detectar y responder a la presencia de unas moléculas aromáticas de bajo peso molecular (flavonoides) secretadas por la planta hacia el suelo a través de las raíces. La composición de la mezcla de flavonoides varía con la especie de la planta y con su estado fisiológico y de desarrollo. Como consecuencia del reconocimiento de estas moléculas, se induce en la bacteria la expresión de los genes de nodulación (*nod*, *nol* y *noe*), los cuales codifican las proteínas encargadas de la síntesis y secreción de otra molécula señal: el lipoquitoligosacárido o factor Nod (FN). Estos factores secretados por la bacteria activan múltiples respuestas en la planta hospedadora, tales como la división de determinadas células del córtex y la curvatura del pelo radical, encaminadas a preparar la invasión bacteriana (Oldroyd 2013; Jones *et al.* 2007).

La naturaleza química de los flavonoides y los factores Nod determina la especificidad de interacción entre el rizobio y la planta hospedadora. La estructura básica del FN consiste en un esqueleto oligosacarídico resultante de la unión de 4 a 5 restos de N-acetilglucosamina, en el que la glucosamina del extremo no reductor está esterificada con un ácido graso. Esta estructura básica del FN puede presentar una serie de modificaciones que varían entre los distintos rizobios, tales como diferente longitud y grado de saturación de la cadena de ácido graso, o presencia de distintos sustituyentes unidos al esqueleto oligosacarídico (residuos fucosil, acetil, metil, carbamoil, arabinosil, sulfuro, etc). Estas modificaciones son las responsables de la especificidad en el reconocimiento por parte del hospedador (Oldroyd *et al.* 2011; Jones *et al.* 2007).

En el modelo de infección más común, el reconocimiento de los FN induce en la planta la curvatura del pelo radical. El extremo del pelo radical, al que están adheridas las bacterias, se curva dejando a éstas “atrapadas” y más próximas a la zona de penetración.

Una vez establecida la adhesión y la curvatura, tiene lugar la infección propiamente dicha, que comienza con una hidrólisis muy localizada de la pared celular de la planta y la invaginación de la membrana plasmática del pelo radical, dando lugar a una estructura tubular denominada canal de infección. Estos canales de infección están formados por una matriz de origen bacteriano y glicoproteína de origen vegetal, y su producción y desarrollo se estimula, entre otras cosas, gracias a los FN y a los exopolisacáridos secretados por la bacteria (Oldroyd *et al.* 2011; Jones *et al.* 2007). El crecimiento dirigido de los canales de infección atravesando las distintas capas de las células de la raíz transporta a los rizobios hasta la zona del primordio nodular. Se cree que enzimas pectinolíticas y celulolíticas secretadas por la planta hospedadora, la bacteria o ambos simbiosomas van degradando las paredes de las células vegetales a medida que el canal de infección se va formando (Robledo *et al.* 2008).

Tras alcanzar el primordio nodular, los canales de infección se ramifican y, a la vez que continúa el desarrollo del nódulo, se produce la liberación de las bacterias en el citoplasma de las células vegetales, rodeadas por una porción de membrana de la célula vegetal denominada membrana peribacteroidal. En su interior, las células del rizobio son capaces de dividirse y de diferenciarse a células especializadas para la fijación de nitrógeno atmosférico llamadas bacteroides. Al conjunto constituido por uno o varios bacteroides rodeados por una membrana peribacteroidal se le conoce con el nombre de simbiosoma (Jones *et al.* 2007).

Los eventos que tienen lugar durante el proceso de infección y los componentes moleculares que los regulan son muy similares y están muy conservados. Sin embargo, tanto la estructura del nódulo como el proceso de diferenciación a bacteroide presentan diferencias importantes dependiendo de la especie de leguminosa. Así se distingue entre nódulos determinados e indeterminados. En el primer caso, cuyo modelo representativo es la simbiosis entre *Lotus japonicus* y *Mesorhizobium loti*, los nódulos se originan por divisiones de las células del córtex central, se caracterizan por poseer un meristemo transitorio en el que las células bacterianas proliferan, se diferencian y entran en senescencia de forma sincronizada, y los bacteroides se pueden aislar y volver a crecer fuera del ambiente del nódulo. Por su parte, los nódulos indeterminados se forman a partir de las células corticales internas, tienen un meristemo persistente que está en continuo crecimiento, y los bacteroides sufren un proceso de diferenciación total caracterizado por eventos de endorreducción genómica y por la imposibilidad de ser cultivados fuera del nódulo. La interacción entre *S. meliloti* y leguminosas del género *Medicago* constituye el modelo representativo de formación de nódulos indeterminados durante la simbiosis (Oldroyd 2013; Oldroyd *et al.* 2011); Jones *et al.* 2007).

4.1. Simbiosis *Sinorhizobium meliloti* – alfalfa.

La interacción entre la bacteria *S. meliloti* y alfalfa (*M. sativa*) constituye un modelo a nivel molecular dentro de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, ya que se dispone de una gran cantidad de información a nivel genético tanto del micro como del macrosimbionte.

En las bases de datos se encuentran disponibles las secuencias completas de los genomas de diversas estirpes silvestres de *S. meliloti*. Es el caso de Rm1021, una de las cepas de referencia dentro de esta especie (Galibert *et al.* 2001). El genoma de Rm1021 tiene un tamaño de 6,7 millones de pares de bases (pb) y está compuesto por tres replicones: el elemento de mayor tamaño es el cromosoma de 3,65 Mb (Capela *et al.* 2001), y los otros dos elementos son conocidos como los megaplásmidos pSymA y pSymB, de 1,35 Mb y 1,68 Mb, respectivamente (Barnett *et al.* 2001; Finan *et al.* 2001).

En el cromosoma se encuentran casi todos los genes constitutivos esenciales para el crecimiento y viabilidad celular, genes *housekeeping* como los encargados del metabolismo de ácidos nucleicos y proteínas, así como todos los genes implicados en

las rutas de biosíntesis universales. Adicionalmente, en este replicón se puede encontrar la información genética necesaria para procesos de movilidad, quimiotaxis y de respuesta a estrés (Capela *et al.* 2001).

El pSymA es el replicón más pequeño de todos, en él se encuentran la mayoría de los genes implicados en nodulación (*nod*) y fijación de N₂ (*nif*, *fix*) (Barnett *et al.* 2001).

En el megaplásmido pSymB se encuentran gran cantidad de genes implicados en sistema de captura de nutrientes y de síntesis de exopolisacáridos (aunque la mayoría de los reguladores transcripcionales de su síntesis se encuentran en el cromosoma). Estudios evolutivos ponen de manifiesto que este replicón fue integrado por un ancestro de *S. meliloti* antes que el pSymA (Finan *et al.* 2001).

Otra de las cepas silvestres de *S. meliloti*, que se ha empleado además en esta Tesis Doctoral, es GR4, aislado de los suelos de Granada (Casadesús & Olivares 1979). El genoma de esta cepa también está secuenciado; tiene un tamaño de 7,14 Mb y cinco replicones: el cromosoma, los dos megaplásmidos homólogos a pSymA y pSymB (pRmeGR4c y pRmeGR4d, respectivamente) y dos plásmidos accesorios (pRmeGR4a y pRmeGR4b) (Martínez-Abarca *et al.* 2013).

Continuando con la simbiosis, como se ha indicado anteriormente *S. meliloti* induce la formación de nódulos indeterminados en las raíces de alfalfa. El proceso de simbiosis comienza con el reconocimiento por parte del rizobio de los flavonoides sintetizados por esta leguminosa, entre los cuales se encuentra la luteolina como flavonoide mayoritario, que a su vez inducen la expresión de los genes *nod* y la síntesis de los FN por parte de la bacteria. Se ha visto que flavonoides provenientes de leguminosas no hospedadoras inhiben la transcripción de los genes *nod* en *S. meliloti* (revisado en Jones *et al.* 2007). La unión de los FN a receptores específicos situados en la superficie celular del pelo radical, dará lugar al comienzo del proceso de infección y desarrollo del nódulo en la raíz de alfalfa. *S. meliloti* sintetiza un pequeño cóctel de FN en los que la cadena de ácido graso, de 16 átomos de carbono, puede tener hasta tres insaturaciones y en los que podemos encontrar grupos acetilo o sulfato como sustituyentes (Perret *et al.* 2000).

Como se ha explicado en el apartado anterior, la curvatura del pelo radical inducida tras el reconocimiento de los FN, ayuda a las células adheridas a la raíz a concentrarse en los puntos de infección. La adhesión por parte de *S. meliloti* presenta similitudes con el desarrollo de biopelículas. Al inicio, las bacterias se adhieren superficialmente como células únicas a la raíz de la planta para dar lugar después a una unión más firme que permita el acúmulo de las mismas (Hirsch *et al.* 2009).

Además de los FN, otros elementos que son cruciales para llevar a cabo de forma exitosa el proceso de infección y posterior invasión por parte de *S. meliloti*, a través del desarrollo del canal de infección, son los polisacáridos extracelulares, principalmente succinoglucano y galactoglucano. Mutantes defectivos en la síntesis de estos exopolisacáridos, especialmente succinoglucano, dan lugar al desarrollo de canales de infección aberrantes, no completándose el proceso de liberación de las bacterias en el primordio nodular (Oldroyd *et al.* 2011; Jones *et al.* 2007).

Por último, tras la liberación de las células del rizobio dentro del citoplasma de las células del nódulo se produce la diferenciación a bacterioide. Dado que en *S. meliloti* se producen eventos de endorreproducción genómica, esta diferenciación suele estar acompañada de un aumento del volumen de la bacteria, así como de un cambio de su morfología de bacilo a formas más o menos distorsionadas.

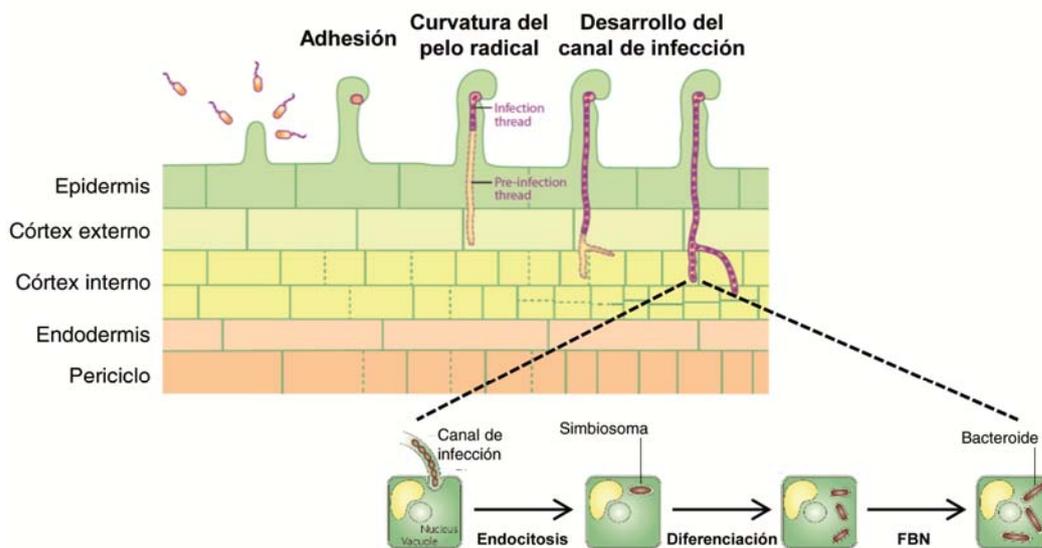


Figura I.9: Etapas en la formación del nódulo y la diferenciación a bacterioide en *S. meliloti*. Imagen adaptada de Oldroyd *et al.* (2011) y Jones *et al.* (2007).

5. Importancia del *swarming* y la formación de biopelículas en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

Una vez establecida la bacteria en los nódulos, en general se admite que la movilidad ya no es necesaria para el desarrollo de los bacteroides o durante el proceso de fijación de nitrógeno. Esto se ha puesto de manifiesto con el hecho de que

cepas afectadas en genes relacionados con movilidad y quimiotaxis son capaces de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno de manera eficiente (Caetano-Anollés *et al.* 1988; Soby & Bergman 1983; Ames & Bergman 1981). Además, en un análisis transcriptómico de *S. meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* comparando células aisladas de nódulos maduros con células en vida libre, se vio una menor expresión de genes flagelares y de quimiotaxis en las primeras (Becker *et al.* 2004; Yost *et al.* 2004). Sin embargo, fenómenos como la quimiotaxis, la movilidad en superficie o la formación de biopelículas pueden ser factores clave para la simbiosis, en tanto en cuanto son importantes para las primeras etapas de la misma que comprenden procesos de adsorción y colonización de la raíz, así como también competencia frente a otros organismos de la rizosfera. En este sentido, se ha demostrado que bacterias con capacidad para moverse son más eficientes en la nodulación o más competitivas que bacterias no móviles (Caetano-Anollés *et al.* 1988; Mellor *et al.* 1987; Ames & Bergman 1981).

La capacidad para desplazarse mediante *swarming* se ha descrito en varias especies de *Rhizobium* entre las que se encuentran *S. meliloti*, *R. etli*, *R. leguminosarum* y *Bradyrhizobium japonicum* (Covelli *et al.* 2013; Tambalo *et al.* 2010; Daniels *et al.* 2006; Soto *et al.* 2002). A continuación se expondrán algunos ejemplos que muestran la implicación de los procesos de movilidad y formación de biopelículas en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, abordándose más en profundidad el caso de nuestra bacteria modelo de estudio *S. meliloti*.

Estudios llevados a cabo en *R. etli* pusieron de manifiesto la importancia del sistema QS *cinIR* y el doble papel de las AHL en el *swarming* de este rizobio (Daniels *et al.* 2006). Mutaciones en *cinIR* impiden la puesta en marcha de esta movilidad. Por su parte, AHL de cadena larga sintetizadas por *R. etli*, además de actuar como moléculas señal de QS, actúan como moléculas surfactantes gracias a su carácter anfipático, facilitando el desplazamiento en superficie de dicha bacteria. Posteriormente, y gracias a la obtención de mutantes afectados en *swarming*, se pudo comprobar que en este rizobio, además de genes relacionados con QS, movilidad, quimiotaxis o flagelos, también tienen un papel importante en el control del *swarming* genes que participan en la síntesis y transporte de polisacáridos, o genes del metabolismo de aminoácidos y poliaminas. Además, algunos de los mutantes obtenidos tenían afectada la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno (Braeken *et al.* 2008).

También se ha descrito la movilidad *swarming* de las cepas 3841 y VF39SM de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Tambalo *et al.* 2010). A diferencia de *R. etli*, no se detectaron moléculas con propiedades surfactantes en la matriz extracelular que rodea la colonia *swarmer* en *R. leguminosarum*, pero sí se observó que células de VF39SM crecidas en el borde de la misma eran células híper-flageladas. Además, Tambalo y colaboradores pusieron de manifiesto la importancia de la densidad celular, la fuente de carbono y la temperatura de incubación para la movilidad en superficie de este rizobio, y observaron que las células *swarmer* de *R. leguminosarum* vb. *viciae* presentaban una mayor resistencia a antibióticos.

Recientemente se han descrito los efectos que tienen los exudados radicales, tanto de hospedadores específicos como inespecíficos, en el *swarming* de *R. leguminosarum* vb. *viciae*. Así, exudados de semillas de lentejas y extractos de musgo estimularon esta movilidad. Sin embargo, el contacto con exudados de semillas de guisante no generó efecto alguno sobre el desarrollo del *swarming*, mientras que los exudados de semillas de haba lo inhibían. El incremento en la expresión del gen *flaA* en células *swarmer* expuestas a los exudados estimuladores, parece ser la causa de esta mayor movilidad (Tambalo *et al.* 2014). Curiosamente, el contacto con exudados procedentes de un mutante de musgo deficiente en la síntesis de estrigolactonas inducía menor movilidad *swarming* en esta bacteria, lo que sugería que las estrigolactonas vegetales podrían estimular la movilidad en superficie de los rizobios. Las estrigolactonas son fitohormonas con funciones diversas en la planta y conocidas como moléculas señalizadoras de la rizosfera por su efecto estimulador de la germinación de plantas parásitas y del establecimiento de simbiosis con hongos formadores de micorrizas arbusculares (Zhang *et al.* 2015; Ruyter-Spira *et al.* 2013). Los datos obtenidos por Tambalo y colaboradores además de demostrar una interacción entre hospedadores no específicos y los rizobios, sugieren la existencia de una ruta de señalización entre *Rhizobium* y los ancestros de las plantas vasculares, previa a la interacción específica entre rizobios y leguminosas (Tambalo *et al.* 2014).

Estudios de movilidad llevados a cabo en *B. japonicum* mostraron que esta bacteria es capaz de desplazarse mediante *swarming* sobre la superficie de medio semisólido (0,5% de agar) (Covelli *et al.* 2013). Además se observó que las colonias ramificadas resultantes de esta translocación están integradas por bacterias alargadas e híper-flageladas asociadas en grupos. La mayor flagelación que sufren estas células se debe al incremento de flagelos laterales, cuya síntesis se encuentra profundamente influenciada por la fuente de carbono.

Aunque la primera vez que se describió el *swarming* en *S. meliloti*, y en *Rhizobium* en general, fue en un mutante afectado en el gen *fadD* (Soto *et al.* 2002), se ha comprobado que diversas cepas silvestres de dicha especie son capaces de desplazarse sobre superficie de medios semisólidos mediante *swarming*. En esta bacteria el *swarming* se ve influenciado por diversos factores como son la concentración y el tipo de agar, la viscosidad del medio, la densidad poblacional, la fuente de nitrógeno y carbono y la concentración de hierro en el medio (Bernabéu-Roda *et al.* 2015; Nogales *et al.* 2010; Soto *et al.* 2002). Más recientemente se ha descrito que una estrigolactona sintética induce el *swarming* en *S. meliloti* (Peláez-Vico *et al.* 2016).

Curiosamente, investigaciones realizadas en el grupo de la Dra. Soto revelaron que el control de la movilidad en superficie en *S. meliloti* es diferente entre distintas cepas silvestres. Así, mientras que la cepa GR4 muestra únicamente *swarming*, las cepas de referencia Rm1021 y Rm2011 se desplazan con una mezcla de *swarming* y un movimiento independiente de flagelos, el cual está facilitado por la producción del sideróforo rhizobactina 1021 (Bernabéu-Roda *et al.* 2015; Nogales *et al.* 2012; Nogales *et al.* 2010). No obstante, la mutación en el gen *fadD* promueve la migración en superficie en todas ellas (Nogales *et al.* 2010; Soto *et al.* 2002). Además, la pérdida de función de FadD conlleva hiper-flagelación y alargamiento celular, así como también causa alteraciones en la expresión génica, ya que en condiciones inductoras de *swarming* aumenta la transcripción de genes flagelares (*flaA*), mientras que disminuye la expresión del gen simbiótico *nodC* en distintas condiciones de crecimiento. A pesar de que el mutante *fadD* es capaz de inducir nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de alfalfa, es menos infectivo y competitivo que la cepa silvestre, probablemente como consecuencia de su menor capacidad para colonizar eficientemente la raíz de la planta (Amaya-Gómez *et al.* 2015; Soto *et al.* 2002). Mediante análisis transcriptómico de un mutante en *fadD* de *S. meliloti* crecido en condiciones inductoras de *swarming* se ha podido comprobar que células crecidas sobre superficie sufren notables cambios en su fisiología con respecto a células que crecen en medio líquido. Dichos cambios quedan reflejados en la expresión diferencial de más de mil genes implicados en distintas actividades metabólicas, captación y metabolismo de hierro, movilidad, quimiotaxis y genes de respuesta a estrés (Nogales *et al.* 2010).

Las cepas silvestres descritas anteriormente (GR4, Rm1021 y Rm2011) son cepas que no tienen un sistema de QS completo por presentar una mutación en el regulador tipo LuxR ExpR. En una cepa *expR*⁺ de *S. meliloti*, Rm8530, se ha descrito y caracterizado un tipo de movimiento en superficie inusual, controlado por QS, al que

se ha denominado *surfing*, que es resultado fundamentalmente de los efectos físico-químicos creados por el galactoglucano o EPS II producido por estas cepas, y además requiere la participación de flagelos (Dilanji *et al.* 2014; Gao *et al.* 2012).

A lo largo de esta Introducción se ha mencionado que en muchas bacterias el *swarming* y la capacidad para formar biopelículas son dos fenotipos que se regulan de forma coordinada y que comparten elementos comunes tanto a nivel de componentes celulares (flagelos, polisacáridos extracelulares) como de sistemas de regulación (QS) (Verstraeten *et al.* 2008). Diversos datos indican que los rizobios se valen de esos mismos elementos a la hora de formar y desarrollar biopelículas.

Rhizobium es capaz de adherirse a las raíces de plantas leguminosas y no leguminosas, lo que supone una ventaja para este grupo de bacterias dentro de la rizosfera y una mayor probabilidad de infección de la planta garantizando el éxito en el establecimiento de la simbiosis (Danhorn & Fuqua 2007). A pesar de que la adhesión es una etapa que parece ser esencial para la simbiosis, aún no se ha descrito ningún mutante de *Rhizobium* completamente afectado en dicha habilidad, aunque sí se ha visto que mutantes con dificultades de adhesión (formación de biopelículas) muestran una reducción en su capacidad de formar nódulos (Hirsch *et al.* 2009). En el proceso de adhesión son importantes tanto los flagelos como los polisacáridos de superficie sintetizados y secretados por el rizobio.

El papel de los flagelos, o de la movilidad en general, para el inicio y desarrollo de biopelículas se ha estudiado en algunas especies de *Rhizobium*. El grupo de la Dra. A. Hirsch (Univ. de California-Los Angeles, USA) fue el primero en demostrar que *S. meliloti* es capaz de desarrollar biopelículas tanto en sustratos inertes como en raíces. Sus investigaciones han puesto de manifiesto que la capacidad de formación de biopelículas de mutantes aflagelados (*fliP* y *flgH*) de este rizobio en placas de PVC se ve disminuida. Aunque en la simbiosis con estos mutantes se forman nódulos fijadores de nitrógeno, se observa un retraso en la aparición de los mismos (Fujishige *et al.* 2006a). Esto concuerda con la idea de que los flagelos facilitan la unión reversible de *Rhizobium* a la raíz. Sin embargo, aún no está claro si el defecto simbiótico causado por la ausencia de flagelos se debe a la incapacidad de movimiento, a los defectos en la formación de biopelículas, o a ambos. Curiosamente, un mutante aflagelado de *Mesorhizobium thianshanense* que mostró mayor capacidad de formar biofilm en superficie de vidrio que la cepa silvestre, sí tenía problemas en su capacidad para adherirse a la raíz (Zheng *et al.* 2015).

En general, mutantes defectivos en la producción de exopolisacáridos (EPS) presentan menor habilidad para formar biopelículas. En *S. meliloti*, mutantes no productores del EPS simbiótico succinoglucano (EPS I) no son capaces de desarrollar biopelículas en superficies abióticas. Por su parte, cepas mutantes en los genes *exoR* y *exoS* súper-productoras de EPS I resultaron significativamente mejores formadoras de biopelículas que la cepa parental, si bien dichas biopelículas eran inestables y se desprendían fácilmente. Sin embargo, estas cepas además de tener exceso de EPS I eran cepas carentes de flagelos, estructuras que, como se ha mencionado antes, también juegan un papel importante para la formación de biopelículas (Fujishige *et al.* 2006a). Por otro lado, la producción de la fracción de bajo peso molecular de EPS II o galactoglucano, cuya síntesis requiere un sistema de QS Sin/EpxR funcional, permite a *S. meliloti* el desarrollo de biopelículas altamente estructuradas en la superficie de los pelos radicales del hospedador. Curiosamente, la incapacidad para sintetizar EPS en un mutante de *Sinorhizobium fredii* HH103, la cual afectaba a la habilidad de esta bacteria de formar biopelículas en superficie abiótica, resultó en una mayor capacidad competitiva por la ocupación de nódulos de soja, aunque causó el efecto contrario en el caso de la simbiosis con *Vigna unguiculata* (Rodríguez-Navarro *et al.* 2014). En otros rizobios como *R. leguminosarum* o *B. japonicum* también se ha podido comprobar el papel relevante que los EPS tienen en la formación de comunidades adheridas a superficie (Wang *et al.* 2008; Russo *et al.* 2006). De manera general se cree que, al igual que para otras bacterias, en *Rhizobium* los exopolisacáridos son importantes para estabilizar la estructura tridimensional de la biopelícula por servir como andamios de otras moléculas que mantienen la biopelícula unida.

Otros polisacáridos producidos por los rizobios son el lipopolisacárido (LPS) y los β -1,2-glucanos. En *S. meliloti*, mutaciones que afectan negativamente a la síntesis de estos polímeros, conducen a una menor capacidad de forma biopelículas tanto en superficies abióticas como en raíces (Fujishige *et al.* 2006b). Es importante mencionar que además de su participación en la etapa de adhesión, estos polímeros extracelulares son requeridos en etapas posteriores de la simbiosis y se les atribuyen varias posibles funciones: i) actuar como molécula señal induciendo procesos específicos de la simbiosis o bloqueando respuestas defensivas de la planta, ii) actuar a modo de barrera que protege a la bacteria de mecanismos de defensa del vegetal, o iii) permitir la adaptación de la bacteria a los distintos ambientes con los que se encontrará a lo largo del proceso infectivo (Zipfel & Oldroyd 2017; Gourion *et al.* 2015; Soto *et al.* 2006).

Aunque es poco lo que se conoce de la producción y de su papel en la simbiosis, la celulosa es otro importante polisacárido para la formación de biopelículas por

Rhizobium o microorganismos muy relacionados. En el caso de algunas de las especies para las que se ha descrito la producción de celulosa, se ha propuesto que dicho polisacárido es requerido para lograr una infección óptima de los pelos radicales y para la formación de agregados tras la adhesión inicial (Robledo *et al.* 2012). Estudios llevados a cabo con la endoglucanasa CelC2 de una cepa silvestre de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, han puesto de manifiesto que alteraciones en los niveles de esta enzima llevan asociadas una reducción de la capacidad de formación de biopelículas tanto en superficies abióticas como *in planta* (Robledo *et al.* 2008).

Por otro lado, se sabe que en *Rhizobium* los sistemas y señales de QS están relacionados con la formación de biopelículas. En *R. etli* se ha visto que las señales de QS participan en la dispersión de biopelículas ya formadas (Daniels *et al.* 2004). Ya se ha mencionado que el sistema de QS Sin/ExpR, a través de la producción de EPS II (y en concreto a través de su fracción de bajo peso molecular), controla la formación de biopelículas en cepas de *S. meliloti* con un *expR* funcional (Rinaudi & Giordano 2010). Por su parte, en *R. leguminosarum* se ha visto que la interrupción del sistema de QS lleva asociada un incremento en la formación de biopelículas (Edwards *et al.* 2009), mientras que en *S. fredii* el mismo fenómeno conlleva una menor habilidad para formar biofilm y defectos en colonización y nodulación de soja (Pérez-Montaña *et al.* 2014).

Finalmente, además de QS, flagelos/movilidad y polisacáridos extracelulares, algunos factores específicos de *Rhizobium* participan en la formación de biopelículas. Por ejemplo, se ha visto que los genes *nod* y sus productos (los FN) en *Rhizobium* no son únicamente esenciales en el proceso de simbiosis, sino que su papel va más allá y también son necesarios para el establecimiento de biopelículas maduras. Se ha observado que mutantes en los genes *nod* son incapaces de formar biopelículas tridimensionales tanto en superficies bióticas como inertes. Esto ha llevado a proponer que además de su función en la morfogénesis del nódulo, el esqueleto del FN funciona como una adhesina que mantiene las células de *Rhizobium* unidas confiriendo a la bacteria mayor resistencia a la desecación y/o a las respuestas defensivas de la planta (Fujishige *et al.* 2008).

Recientes estudios llevados a cabo en el grupo de la Dra. Soto indican que genes y factores medioambientales que afectan la movilidad *swarming* y a la formación de biopelículas en *S. meliloti* también influyen en su capacidad simbiótica.

Ya se ha mencionado anteriormente que los niveles de hierro en el medio constituyen una señal medioambiental que controla la capacidad de movimiento en

superficie, pero también la capacidad de formar biopelículas de *S. meliloti*. Así, altas concentraciones de hierro inhiben específicamente la translocación en superficie en esta bacteria al mismo tiempo que inducen la formación de biopelículas altamente estructuradas que se desarrollan más rápido que aquellas formadas en presencia de bajos niveles de hierro (Amaya-Gómez *et al.* 2015, 2013). En relación a esto, se ha visto que genes implicados en la biosíntesis del sideróforo rhizobactina 1021 desempeñan un papel clave en el movimiento en superficie y el desarrollo de biopelículas maduras de la cepa Rm1021 de *S. meliloti*. Así, la pérdida de función del regulador global de la respuesta al hierro, *rirA*, que conlleva producción constitutiva del sideróforo, induce translocación en superficie, incluso en presencia de altos niveles de hierro, e interfiere negativamente con el desarrollo normal de biopelículas. No obstante, el papel de los genes implicados en el metabolismo del hierro en el *swarming* y la formación de biofilm no está exclusivamente ligado al mantenimiento de la homeostasis intracelular de dicho elemento. La rhizobactina 1021 tiene propiedades surfactantes que podrían ser, al menos en parte, responsables de los fenotipos en translocación en superficie y formación de biopelículas de *S. meliloti* (Nogales *et al.* 2012). De esta forma, el control sobre la producción de rhizobactina podría ser la causa final del efecto del hierro y de la mutación *rirA* en dichos fenómenos asociados a superficie. De acuerdo con esto, la cepa GR4, que es incapaz de producir el sideróforo, se muestra menos propensa a desplazarse sobre superficie que la cepa Rm1021 que sí lo produce; y al mismo tiempo es mejor formadora de biofilms tanto en sustratos abióticos como sobre la superficie de raíces de alfalfa, pudiendo ser ésta una de las razones del mejor comportamiento simbiótico de GR4 (Amaya-Gómez *et al.* 2015). El análisis de distintas propiedades simbióticas de cepas de *S. meliloti* mutantes en genes del metabolismo del hierro y alteradas en movilidad en superficie y formación de biopelículas, ha puesto de manifiesto que, aunque son capaces de desarrollar nódulos en plantas de alfalfa, la mayoría exhiben algún defecto simbiótico en mayor o menor grado.

Junto con el hierro y los determinantes bacterianos implicados en su metabolismo, el gen *fadD* constituye otro elemento que participa en la regulación inversa de *swarming* y formación de biofilm. Como se ha mencionado anteriormente, la primera vez que se describió este tipo de movimiento en *S. meliloti* fue precisamente en un mutante derivado de la cepa GR4 y afectado en este gen (QS77) (Soto *et al.* 2002). FadD es una acil-CoA ligasa específica de ácidos grasos de cadena larga, actividad requerida para que estos ácidos grasos puedan entrar en la ruta de β -oxidación. La pérdida de función de FadD, además de inducir movilidad en superficie en *S. meliloti*, dificulta el establecimiento de biopelículas en dicha bacteria e interfiere negativamente

con el proceso de colonización y nodulación de plantas de alfalfa (Amaya-Gómez *et al.* 2015; Soto *et al.* 2002).

6. Identificación de la 2-Tridecanona y evaluación de sus efectos en motilidad en *Sinorhizobium meliloti*.

Se ha descrito que mutantes de la bacteria fitopatógena *X. campestris* pv. *campestris* afectados en el gen *rpfB* muestran menor virulencia (Barber *et al.* 1997). El gen *rpfB* es homólogo a *fadD* y forma parte de un clúster de genes (*rpf*) que participan en la producción/detección del ácido 11-metil-*cis*-2-dodecenoico, señal de QS de la familia DSF (ver apartado 3.1.2), que controla la producción de factores de patogenicidad. Hoy se sabe que RpfB codifica una proteína con actividad FadD (Bi *et al.* 2014) que participa en el *turnover* de señales DSF, siendo un mecanismo a través del cual la bacteria consigue salir del estado QS (Wang *et al.* 2016; Zhou *et al.* 2015). La naturaleza de los fenotipos asociados a la mutación en *fadD* en *S. meliloti* (estimulación de la movilidad en superficie, alteración de expresión de genes simbióticos y de movilidad, impedimentos en la formación de biofilm y defectos en la capacidad de nodular plantas de alfalfa), llevó al grupo de la Dra. Soto a sugerir la hipótesis de que también en esta bacteria compuestos de naturaleza lipídica, relacionados con la actividad FadD, podrían actuar como señales capaces de controlar *swarming* y la capacidad simbiótica de la bacteria. Por ello, se decidió investigar en profundidad esta cuestión caracterizando a nivel bioquímico la cepa QS77.

En colaboración con los Dres. Isabel López-Lara y Otto Geiger (Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Cuernavaca, Méjico), se abordó la identificación de compuestos de naturaleza lipídica que aparecieran de manera diferencial en cepas silvestre y *fadD*⁻ de *S. meliloti*. Dicha caracterización reveló que en el sobrenadante de cultivos líquidos crecidos hasta fase estacionaria del mutante se acumulaban ácidos grasos libres (Pech-Canul *et al.* 2011) y dos compuestos de naturaleza volátil: el aldehído dodecanal y la metilcetona (MK) 2-Tridecanona (2-TDC), compuestos que no se detectaron en los cultivos de la cepa silvestre.

El análisis del efecto en movilidad de algunos de los compuestos acumulados diferencialmente en el mutante QS77 mostró que sólo la adición de 2-TDC al medio de cultivo promovía el desplazamiento en superficie de cepas silvestres de *S. meliloti*, y

que dicha estimulación era dependiente de dosis (Figura 1.10a). Esto mismo, aunque con un efecto más pronunciado, se conseguía aplicando la 2-TDC en su forma volátil (Figura 1.10b). Estudios posteriores revelaron que esta MK, que no tiene efectos sobre el crecimiento bacteriano, induce específicamente movilidad en superficie, ya que no altera la movilidad tipo *swimming* (Figura 1.10c). Además, el efecto promotor es ejercido no sólo sobre cepas silvestres sino también sobre derivadas aflageladas, lo cual indica que, además de *swarming*, la 2-TDC activa un movimiento independiente de flagelos (Figura 1.10d) (Bernabéu-Roda 2014).

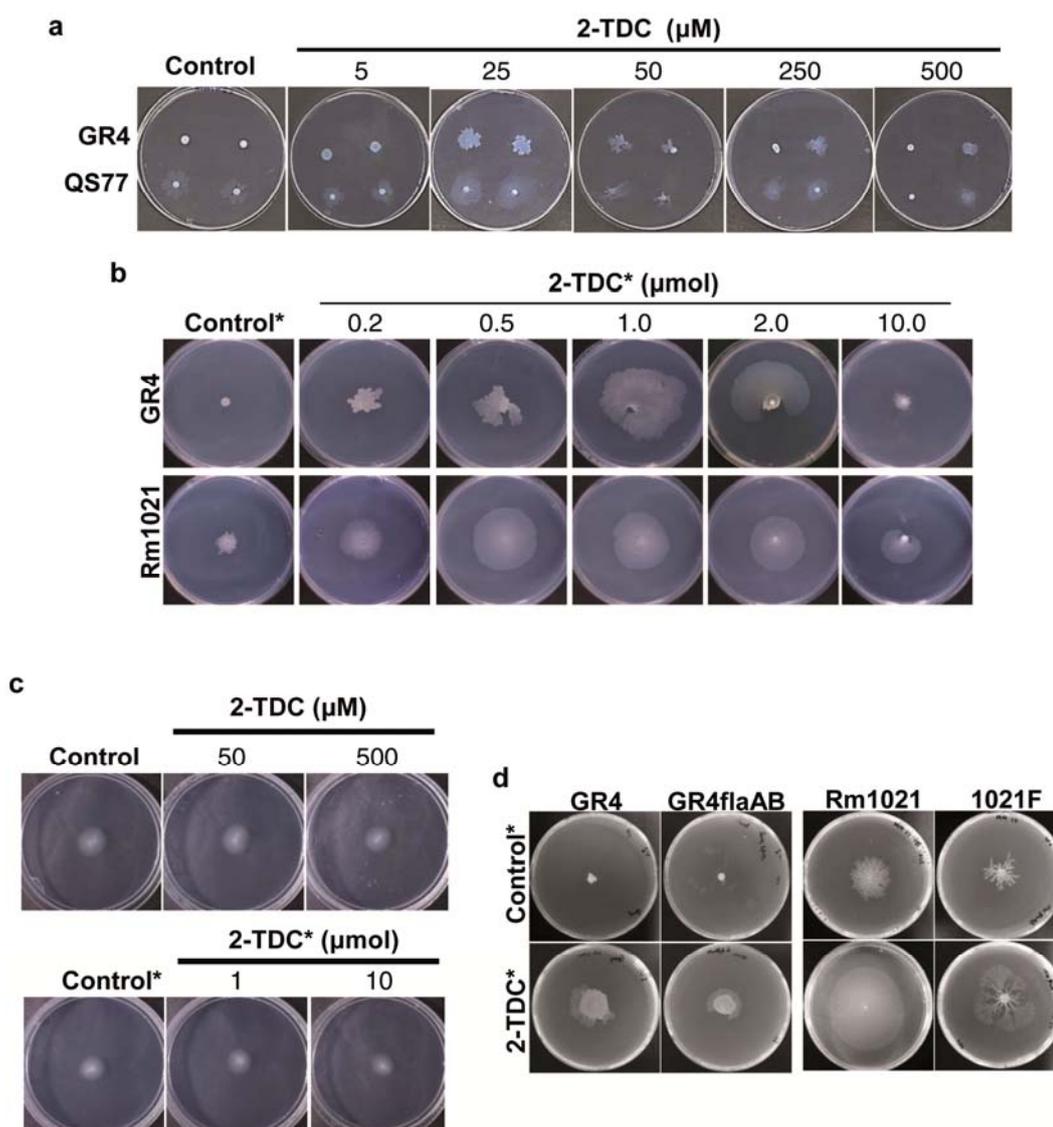


Figura 1.10: Movilidad de *S. meliloti* en respuesta a 2-TDC. La imagen muestra la movilidad de distintas cepas de *S. meliloti* crecidas en medio semisólido en presencia de distintas cantidades de 2-TDC **(a)** disuelta en el medio y **(b)** aplicada como volátil (*). **(c)** Efecto de la 2-TDC en la movilidad *swimming*. **(d)** Movilidad de cepas aflageladas de *S. meliloti* en respuesta a 2-TDC en su forma volátil.

La 2-TDC, o metil-undecil-cetona, es un compuesto volátil, conocido clásicamente como insecticida natural, ya que, producido en grandes cantidades por los tricomas glandulares tipo VI de variedades silvestres de tomate, *Solanum habrochaites* subsp. *glabratum*, es responsable de la alta resistencia de estas plantas al ataque de insectos herbívoros (Williams *et al.* 1980). Las variedades cultivables de tomate, *Solanum lycopersicum*, producen unas 70 veces menos cantidad de 2-TDC, por lo que han perdido esa resistencia natural. Posteriormente, diversos estudios han demostrado que la 2-TDC posee actividad insecticida y acaricida (Antonious *et al.* 2003), y es útil incluso como repelente de mosquitos y garrapatas (Kimps *et al.* 2011; Innocent *et al.* 2008). La 2-TDC, sin embargo, no es exclusiva de plantas de tomate y se ha identificado en otras plantas, como por ejemplo, en bulbos de cebolla, asignándole un papel protector frente al ataque de insectos y de arañas (Antonious 2013). También se ha identificado como constituyente de los aceites esenciales de diversos vegetales (Kirillov *et al.* 2016).

Además de en plantas, la producción de 2-TDC ha sido identificada en animales. En abejas obreras, por ejemplo, se ha comprobado la presencia de esta molécula en las glándulas mandibulares de estos insectos en los que parece ser responsable de inducir respuestas agresivas relacionadas con la fuente de alimento al actuar como feromona (Schorkopf *et al.* 2009). En el ciervo *Odocoileus hemionus columbianus*, se ha identificado este compuesto, junto a otras moléculas de estructura similar, como el principal componente secretado por las glándulas interdigitales, probablemente implicado en comunicación semioquímica (Wood *et al.* 1995).

En cuanto a los microorganismos, además de haberse detectado en hongos, existen ya en la bibliografía una gran cantidad de estudios en los que se describe la producción de 2-TDC en más de treinta especies bacterianas, procedentes de muy diversos hábitats, incluyendo bacterias de la rizosfera (Tabla I.1). En la mayoría de esos estudios, la 2-TDC se ha identificado utilizando metodología específica para detectar volátiles, y en ellos se ha puesto de manifiesto la influencia del medio de cultivo, tanto en referencia a los componentes y su concentración, como a si se trata de líquido o sólido, en la composición de la mezcla de volátiles y la abundancia de cada uno.

Por lo tanto, la 2-TDC es una molécula ampliamente distribuida en la naturaleza que pertenece a una familia, las metilcetonas, cuyos miembros se ha descrito que pueden participar en procesos de señalización bacteriana (Audrain *et al.* 2015a). A raíz de esto, las investigaciones del grupo se han centrado en estudiar el mecanismo mediante el cual la 2-TDC es capaz de inducir el desplazamiento en superficie de *S.*

meliloti, y el papel que puede ejercer esta molécula en la interacción de la bacteria con su planta hospedadora.

Tabla I.1: Producción de 2-TDC en bacterias

Especie	Medio de cultivo	Método de extracción/detección	Cantidad	Referencia
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	MS agar	SPME/GC-MS	5.25 µg	Raza <i>et al.</i> 2016
<i>B. cereus</i>	Angle agar	HS (TDS tube)/GC-MSD	0.10 ng	Blom <i>et al.</i> 2011
<i>Burkholderia ambifaria</i>	LB agar	CLSA/GC-MS	0-10% ^a (ng range)	Groenhagen <i>et al.</i> 2013
<i>B. andropogonis</i>	Angle agar	HS (TDS tube)/GC-MSD	0.08 ng	Blom <i>et al.</i> 2011
<i>B. anthina</i>	Angle agar	HS (TDS tube)/GC-MSD	0.06 ng	Blom <i>et al.</i> 2011
<i>B. caledonica</i>	Angle agar	HS (TDS tube)/GC-MSD	0.10 ng	Blom <i>et al.</i> 2011
<i>B. fungorum</i>	Angle agar	HS (TDS tube)/GC-MSD	0.08 ng	Blom <i>et al.</i> 2011
<i>B. glathei</i>	LB agar	HS (TDS tube)/GC-MSD	0.13 ng	Blom <i>et al.</i> 2011
<i>B. graminis</i>	LB y MR-VP agar	HS (TDS tube)/GC-MSD	0.41 and 1.34 ng	Blom <i>et al.</i> 2011
<i>B. lata</i>	Angle agar	HS (TDS tube)/GC-MSD	0.08 ng	Blom <i>et al.</i> 2011
<i>B. phenoliruptrix</i>	Angle agar	HS (TDS tube)/GC-MSD	0.07 ng	Blom <i>et al.</i> 2011
Grupo CFB	Marine Agar	CLSA/GC-MS	0-2% ^b	Dickschat <i>et al.</i> 2005
<i>Citrobacter freundii</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	1.37 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>Enterobacter aerogenes</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	0.48 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>E. agglomerans</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	3.48 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>E. cloacae</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	0.31 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>Enterococcus durans</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	0.77 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>E. faecium</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	4.54 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>Escherichia coli</i>	I) Angle y MR-VP agar	I) HS (TDS tube)/GC-MSD	I) 0.23 and 0.11 ng	I) Blom <i>et al.</i> 2011
	II) TSB líquido	II) HS (Super Q)/GC-MS	II) 164 ng	II) Elgaali <i>et al.</i> 2002
	III) PCA agar	III) HS (Super Q)/GC-MS	III) 19-44 ng	III) Yu <i>et al.</i> 2000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	0.88 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>Lactococcus lactis</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	1.1 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	1.19 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002

<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	Medio líquido "Brain Heart Infusion"	Fracionamiento del sobrenadante mediante cromatografía en fase reversa con columna C18 y GC-MS	ND	Casillo <i>et al.</i> 2017
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Angle agar	HS (TDS tube)/GC-MSD	0.11 ng	Blom <i>et al.</i> 2011
<i>Pseudomonas</i> spp.	King's B agar	SPME/GC-MS	ND	Giorgio <i>et al.</i> 2015
<i>Salmonella paratyphi</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	0.58 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>Serratia plymuthica</i>	I) 0,1L NB líquido II) LB y MS agar	I) HS (Super Q)/GC-MS II) HS (TDS tube)/GC-MSD	I) ND II) 0.13 and 0.48 ng	I) Weise <i>et al.</i> 2014 II) Blom <i>et al.</i> 2011
<i>S. proteamaculans</i>	0,1L NB líquido	HS (Super Q)/GC-MS	ND	Weise <i>et al.</i> 2014
<i>S. marcescens</i>	I) 0,1L NB líquido II) LB agar	I) HS (Super Q)/GC-MS II) HS (TDS tube)/GC-MSD	I) ND II) 0.28 ng	I) Weise <i>et al.</i> 2014 II) Blom <i>et al.</i> 2011
<i>S. odorifera</i>	0,1L NB líquido	HS (Super Q)/GC-MS	ND	Weise <i>et al.</i> 2014
<i>Shigella sonnei</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	3.29 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>Streptococcus thermophilus</i>	TSB líquido	SPME/GC-MS	0.98 10 ⁵ counts ^c	Elgaali <i>et al.</i> 2002
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	I) 10L NB líquido II) NB y NBG agar	I) HS (Super Q)/GC-MS II) SPME/GC-MS o PTR-MS	I) 17.5% ^b II) 10 ⁵ -10 ⁶ counts ^c	Weise <i>et al.</i> 2012

ND, no determinado; ^a relativo al pico de mayor área del cromatograma; ^b contribución relativa con respecto a la mezcla de volátiles; ^c área del pico en el cromatograma.

Abreviaturas: CBF *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*; SPME, *Solid Phase MicroExtraction*; GC-MS, *Gas Chromatography Mass Spectrometry*; HS, *HeadSpace trapping*; CLSA, *Closed-Loop Stripping Analysis*; GC-MSD, *Gas Chromatography with Mass Selective Detection*.

OBJETIVOS

Objetivos

Conocer y comprender los mecanismos moleculares involucrados en la simbiosis mutualista que las bacterias del suelo denominadas comúnmente como *Rhizobium* establecen con plantas leguminosas, no sólo tiene interés por la importancia ecológica y agronómica de esta asociación, sino que supone un excelente modelo para el estudio general de las interacciones planta-bacteria.

La información que hoy día se tiene acerca de cómo la bacteria induce la formación del nódulo donde va a tener lugar el proceso de fijación biológica del nitrógeno, así como de los elementos que participan y regulan dicho proceso, es muy amplia y detallada. Sin embargo, sigue siendo escaso el conocimiento sobre los mecanismos y determinantes moleculares, o los factores ambientales, implicados en las etapas más tempranas de la interacción, como son la adsorción y la colonización de la superficie de la raíz por parte de la población bacteriana.

Con el objetivo de identificar mecanismos moleculares importantes en las primeras etapas de la interacción, en el grupo Genética de Infecciones Fitobacterianas, donde se ha realizado esta Tesis Doctoral, se utiliza como estrategia la caracterización del *swarming* en la bacteria modelo *Sinorhizobium meliloti*, simbiote de alfalfa. El *swarming* es un tipo de translocación bacteriana en superficie que ha sido muy estudiado en bacterias patógenas por estar íntimamente relacionado con la virulencia de estos microorganismos. Los pocos datos existentes en rizobios sobre este fenómeno bacteriano asociado a superficie indican que determinantes del *swarming* o que se co-regulan con él, también pueden ser importantes en la interacción con la planta. Las investigaciones realizadas en *S. meliloti* han permitido la identificación de la metilcetona 2-Tridecanona (2-TDC) como un compuesto de naturaleza volátil capaz de alterar la movilidad en superficie de esta bacteria. Estudiar a nivel molecular cómo este agente químico es capaz de controlar un fenotipo tan importante en una bacteria modelo que interacciona con plantas, así como investigar posibles efectos adicionales, podría desvelar nuevos componentes y mecanismos reguladores empleados por las bacterias durante la interacción con sus plantas hospedadoras. Este conocimiento podría ser utilizado para controlar la infección por bacterias patógenas, o para el diseño de microorganismos beneficiosos más efectivos.

Por todo ello, el **Objetivo General** de esta Tesis Doctoral ha sido identificar nuevos mecanismos moleculares que participan en las etapas iniciales del establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, a través de un estudio en profundidad de los efectos producidos por la 2-TDC en la biología de la bacteria modelo *S. meliloti*, tanto

en vida libre como en simbiosis, y la identificación de algunas de las bases moleculares responsables del modo de acción de este compuesto.

Para la consecución de este objetivo general se han propuesto los siguientes objetivos específicos:

- 1- Determinar los efectos causados por la aplicación de 2-TDC en diversos aspectos mostrados por *S. meliloti* en vida libre, tales como la motilidad, morfología y la formación de biopelículas, y en la capacidad de establecer simbiosis mutualista con plantas de alfalfa.
- 2- Identificar genes de *S. meliloti* implicados en el mecanismo de acción de la 2-TDC, mediante el aislamiento de mutantes insensibles a la metilcetona, y abordar la caracterización funcional en profundidad de alguno de ellos.
- 3- Identificar genes de *S. meliloti* cuya actividad transcripcional se altere en respuesta a 2-TDC, mediante la estrategia de las trampas génicas y caracterización detallada de alguno de ellos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Técnicas microbiológicas.

1.1. Cepas y plásmidos utilizados.

En las Tablas M1 y M2 se describen las cepas de *S. meliloti* y *E. coli*, así como los plásmidos empleados en este trabajo, junto con sus características más relevantes.

Tabla M1: Cepas utilizadas en este trabajo

Bacteria	Características relevantes	Referencias
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>		
NTL4+ (pZLR4)	Derivado de NT1 con una delección interna en el locus <i>tetC58</i> ; <i>traG::lacZ</i> ; pPHU-fadL _{sm} ; Tc ^r , Gm ^r .	(Krol & Becker 2014)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44</i> , Δ <i>lacU169</i> , <i>f80</i> , <i>LacZ</i> Δ M, <i>5hsdR171</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Bethesda Research Laboratory
S17-1	<i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>recA</i> , <i>hsdR</i> , <i>hsdM</i> , RP4-2-Tc::Mu, Km::Tn7; Tp ^r , Sm ^r	(Simon <i>et al.</i> 1983)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
PAO1-L	Cepa silvestre, sublínea Lausanne	Colección Dieter Haas
PADP44	PAO1-L::(<i>miniTn7::Prn-gfp</i>), Gm ^R	Este trabajo
<i>Pseudomonas syringae</i>		
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	Cepa silvestre; Rif ^R	(Cuppels 1986)
<i>P. syringae</i> pv. <i>syringae</i> BT111	Cepa silvestre	(Miguel <i>et al.</i> 2000)
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium		
LT2	Cepa silvestre	Colección J. Casadesús/ <i>Salmonella Genetic Stock Centre</i> , Universidad de Calgary, Alberta, Canada.
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
Rm1021	Cepa silvestre; Nod ⁺ , Fix ⁺ , SU47 <i>expR102::ISRm2011-1</i> ; Smr.	(Meade & Signer 1977)
GR4	Cepa silvestre; Nod ⁺ , Fix ⁺ , <i>expR</i>	(Casadesús & Olivares 1979)
GR4A	Cepa silvestre; Nod ⁺ , Fix ⁺	(Casadesús & Olivares 1979)
GR4- <i>gfp</i>	GR4 (pHC60); Tc ^r	(Amaya-Gómez <i>et al.</i> 2015)
Rm1021- <i>gfp</i>	Rm1021 (pHC60); Tc ^r	(Amaya-Gómez <i>et al.</i> 2015)
GR4sinI	GR4 (<i>sinI::Tn5</i>); Km ^r .	Nogales
Smais	Derivada de Rm2011; ExpR ⁺ , <i>sinI</i> , <i>wgeA::cerulean</i> , <i>sinI::mCherry</i> , <i>smb20911::mVenus</i>	(McIntosh, no publicado)
QS77	GR4 (<i>fadD::Tn5</i>); Km ^r .	(Soto <i>et al.</i> 2002)
GR4C	GR4::Tn5; Km ^r .	Este trabajo
GRS2015	GR4 (<i>smc01368::Tn5</i>); Km ^r .	Este trabajo
GRS4012	GR4 (<i>smc02160::Tn5</i>); Km ^r .	Este trabajo
GRS1	GR4 (<i>smc02160::Tn5</i>); Km ^r .	Este trabajo
GRS577	GR4 (<i>ntrY::Tn5</i>); Km ^r .	Este trabajo
GRS1452	GR4 (<i>ntrY::Tn5</i>); Km ^r .	Este trabajo
GRS1980	GR4 (<i>ntrY::Tn5</i>); Km ^r .	Este trabajo

GRS2175	GR4 (<i>ntrY</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GRS2238	GR4 (<i>ntrY</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GRS2007	GR4 (<i>smc00190</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GRS3009	GR4 (<i>relA</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GRS1457	GR4 (<i>sma1398</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GRS5662	GR4 (<i>sma0137</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GTI1181	GR4 (<i>smc01368</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GTI369	GR4 (<i>flhA</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GTI1138	GR4 (<i>flgG</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GTI878	GR4 (<i>flgG</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GTI43	GR4 (<i>smc02081</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GTI164	GR4 (<i>smc03141</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GTI302	GR4 (<i>smc04454</i> ::Tn5); Km ^r .	Este trabajo
GR4ΔflaAB	<i>flaAflaB</i> ::Hyg; Hyg ^r	Bernabéu-Roda <i>et al.</i> 2015)
GR4Y	GR4 Δ <i>exoY</i>	Este trabajo
GR4YntrY	GR4Y conteniendo la mutación <i>ntrY</i> ::Tn5 procedente de la cepa GRS2175; Km ^r .	Este trabajo
GR4J	GR4 conteniendo el plásmido pJB3Tc19; Tc ^r .	Este trabajo
577J	GRS577 conteniendo el plásmido pJB3Tc19; Km ^r , Tc ^r .	Este trabajo
577JY	GRS577 conteniendo el plásmido pJB3-ntrY; Km ^r , Tc ^r .	Este trabajo
577JX	GRS577 conteniendo el plásmido pJB3-ntrX; Km ^r , Tc ^r .	Este trabajo
577JYX	GRS577 conteniendo el plásmido pJB3-ntrYX; Km ^r , Tc ^r .	Este trabajo
GR4T	GR4 conteniendo el plásmido pTE3; Tc ^r .	Este trabajo
577T	GRS577 conteniendo el plásmido pTE3; Km ^r , Tc ^r .	Este trabajo
577TNR	GRS577 conteniendo el plásmido pTE3-visNR; Km ^r , Tc ^r .	Este trabajo
GR4luxC	GR4::Tn5 <i>luxCDABE</i> ; Km ^r .	Este trabajo
GTR3033	GR4 (<i>smb20345</i> ::Tn5 <i>luxCDABE</i>); Km ^r .	Este trabajo
GTR13136	GR4 (<i>smb20342</i> ::Tn5 <i>luxCDABE</i>); Km ^r .	Este trabajo
GTR15852	GR4 (<i>smb20342</i> ::Tn5 <i>luxCDABE</i>); Km ^r .	Este trabajo
G20345i	GR4 (<i>smb20345</i> ::pK18 <i>mob</i>); Km ^r .	Este trabajo

Tabla M2: Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pCR®-XL-TOPO®	Vector de clonación para productos de PCR; Km ^r	Invitrogen®
pCR®-2.1-TOPO®	Vector de clonación para productos de PCR; Ap ^r , Km ^r	Invitrogen®
pUC18	Vector de clonación; Ap ^r .	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985)
pSUP202	pBR325:: <i>mob</i> ; Ap ^r , Tc ^r , Cm ^r .	(Simon <i>et al.</i> 1983)
pSUP2021	Vector pBR325:: <i>mob</i> que contiene el Tn5; Tc ^r , Cm ^r , Ap ^r , Km ^r .	(Simon <i>et al.</i> 1983)
pJB3Tc19	Vector de clonación y expresión; Tc ^r , Ap ^r .	(Blatny <i>et al.</i> 1997)
pK18 <i>mob</i>	Plásmido suicida; Km ^r	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pK18 <i>mobsacB</i>	Plásmido suicida; Km ^r	(Schäfer <i>et al.</i> , 1994)
pTE3	Vector de expresión con el promotor <i>trp</i> ; Tc ^r .	(Egelhoff & Long 1985)

pMP220	Vector para construir fusiones transcripcionales a <i>lacZ</i> ; Tc ^r .	(Spaink <i>et al.</i> 1987)
pPHU231	Derivado de pRK290 con un inserto de 388 pb conteniendo el polylinker de pUC18; Tc ^r	(Hübner <i>et al.</i> 1991)
pWBT5	Vector de expresión derivado de pSRK-Gm que contiene los promotores inducibles Plac y PT5 en tándem	(Schlüter <i>et al.</i> 2015)
pHC60	Plásmido que expresa constitutivamente GFP; Tc ^r .	(Cheng & Walker 1998)
pLK64	Derivado de pPHU231 que contiene la fusión traduccional <i>sinI::egfp</i> ; Tc ^r .	(McIntosh <i>et al.</i> 2008)
pLK115	Derivado de pPHU231 que contiene la fusión traduccional <i>wgeA::egfp</i> ; Tc ^r .	(Charoenpanich <i>et al.</i> 2013)
pGUS3	Plásmido con la fusión entre el promotor del gen <i>nfeD</i> y el gen <i>gusA</i> del pBI100; Km ^r	(García-Rodríguez & Toro, 2000)
pGD499	Vector con la fusión transcripcional <i>npt::lacZ</i> ; Tc ^r .	(Ditta <i>et al.</i> 1985)
pCHK57	Vector con la fusión transcripcional <i>nifA::lacZ</i> ; Tc ^r .	(Ditta <i>et al.</i> 1987)
pUT/mini-Tn5 <i>luxCDABE</i>	Derivado del plásmido suicida pUT-miniTn5 que porta el operón <i>luxCDABE</i> sin promotor; Km ^r .	(Winson <i>et al.</i> 1998)
pPHUmCherry	Derivado del plásmido pPHU231 que contiene el gen <i>mCherry</i> sin promotor; Tc ^r .	(McIntosh, no publicado)
pK18-Δ <i>exoY</i>	pK18 <i>mobsacB</i> portando la versión delecionada del gen <i>exoY</i> de <i>S. meliloti</i> ; Km ^r .	(Nogales <i>et al.</i> 2012)
pUC-E2175	pUC18 portando el fragmento <i>EcoRI</i> que contiene la mutación <i>ntrY::Tn5</i> de GRS2175; Ap ^r , Km ^r .	Este trabajo
pSUP202-E2175	pSUP202 portando el inserto <i>EcoRI</i> ide pUC-E2175; Ap ^r , Tc ^r .	Este trabajo
pK18- Δ <i>ntrY</i>	pK18 <i>mobsacB</i> portando la versión delecionada del gen <i>ntrY</i> de <i>S. meliloti</i> ; Km ^r .	Este trabajo
pJB3- <i>ntrYX</i>	pJB3Tc19 con los genes <i>ntrYX</i> de <i>S. meliloti</i> clonados aguas abajo del promotor de <i>lacZ</i> ; Tc ^r .	Este trabajo
pJB3- <i>ntrY</i>	Derivado de pJB3- <i>ntrYX</i> en el que se ha delecionado parte de la secuencia codificante del gen <i>ntrX</i> ; Tc ^r .	Este trabajo
pJB3- <i>ntrX</i>	pJB3Tc19 con el gen <i>ntrX</i> de <i>S. meliloti</i> clonado aguas abajo del promotor de <i>lacZ</i> ; Tc ^r .	Este trabajo
pTE3- <i>visNR</i>	Derivado de pTE3 portando los genes <i>visNR</i> de <i>S. meliloti</i> aguas abajo del promotor <i>trp</i> ; Tc ^r .	Este trabajo
pMP-Sm <i>nor</i>	Derivado de pMP220 que porta la fusión transcripcional <i>norECB::lacZ</i> ; Tc ^r .	Este trabajo
pMP-Sm <i>nir</i>	Derivado de pMP220 que porta la fusión transcripcional <i>nirK::lacZ</i> ; Tc ^r .	Este trabajo
pPHU20346	Derivado de pPHUmCherry conteniendo la fusión traduccional <i>smb20346::mCherry</i> ; Tc ^r .	Este trabajo
pPHU20347	Derivado de pPHUmCherry conteniendo la fusión traduccional	Este trabajo

	<i>smb20347::mCherry; Tc^r.</i>	
pMP20347	Derivado de pMP220 conteniendo la fusión transcripcional <i>smb20347::lacZ; Tc^r.</i>	Este trabajo
pK20345i	pK18 <i>mob</i> conteniendo un fragmento interno del gen <i>smb20345</i> de <i>S. meliloti</i> .	Este trabajo
pWBT20345	Derivado de pWBT5 que contiene la secuencia codificante del gen <i>smb20345</i> de <i>S. meliloti</i> .	Este trabajo

1.2. Medios de cultivo.

Medios de cultivo para *E. coli* y *A. tumefaciens*

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

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

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

Cuando fue requerido, *A. tumefaciens* se creció en medio mínimo manitol-glutamato (**MGM**), cuya composición es la siguiente:

Na₂HPO₄·2H₂O.....11 g
 KH₂PO₄3 g
 NaCl.....0,5 g
 Glutamato sódico.....1 g
 Manitol.....10 g
 MgSO₄·7H₂O.....0.246 g
 Agar (para medio sólido).....15 g
 Agua desionizada.....1000 ml

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

Biotina (1 mg/ml en NaOH 0,1 M).....1 ml
 CaCl₂ (1 M).....200 µl

La biotina y el CaCl₂ se esterizaron por filtración y se adicionaron al medio autoclavado.

Medios de cultivo para rizobios

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

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

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

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

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

Para los ensayos de *swarming* se usó una concentración del 0.6% o 1% de agar Noble Difco™. Se ajustó a un pH de 6.8, y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

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

Biotina.....	0,2 g
Clorhidrato de tiamina.....	0,1 g
Pantotenato sódico.....	0,1 g
Agua destilada.....	1000 ml

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

Cuando fue requerido, las cepas de *Rhizobium* se crecieron en medio mínimo tamponado con ácido 3-morfolino-4-propano-1-sulfónico (**MOPS**) (Zhan *et al.* 1991):

MOPS.....	10 g
Manitol.....	10 g
Glutamato sódico.....	3,9 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,246 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se ajustó el pH a 7,0 con KOH 5M y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

CaCl ₂ ·2H ₂ O (37 g/l).....	1 ml
FeCl ₃ ·6H ₂ O (40 g/l).....	250 µl
Minerales:.....	1 ml
H ₃ BO ₃ (3 g/l)	
MnSO ₄ ·H ₂ O (1,7 g/l)	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (0,3 g/l)	
NaMoO ₄ ·2H ₂ O (0,12 g/l)	
CoCl ₂ ·6H ₂ O (0,065 g/l)	
K ₂ HPO ₄ (1 M).....	100 µl
Biotina (1 mg/ml).....	1 ml

Estos componentes se esterilizaron por filtración y se adicionaron al medio autoclavado.

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

Triptona.....	0,4 g
Extracto de levadura.....	0,1 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g
Agar Bacteriológico.....	3 g
Agua destilada.....	1000 ml

Para detectar la súper-producción de EPS I se añadió a las placas de TY o MM el colorante fluorescente Calcofluor-White M2R (*fluorescent brightener 28*; Sigma-Aldrich) a una concentración de 0,02% p/v.

1.3. Antibióticos.

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas (100X) de los mismos en agua desionizada y posterior esterilización con unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. En el caso de la solución de tetraciclina no fue necesaria la esterilización por filtración ya que se empleó metanol para disolverla. La concentración final de los distintos antibióticos utilizados en este trabajo se indica en la Tabla M3.

Tabla M3: Antibióticos

Antibiótico	Concentración (µg/ml)	
	<i>E. coli</i>	<i>S. meliloti</i>
Ampicilina (Ap)	200	-
Espectinomicina (Spc)	100	100
Sulfato de estreptomicina (Sm)	50	200
Sulfato de kanamicina (Km)	50	200 ^a
Tetraciclina (Tc) ^b	10	10
Higromicina (Hyg)	-	75
Gentamicina (Gm) ^b	8	40

^a Para las cepas de *S. meliloti* que contienen el transposón Tn5luxCDABE es necesario reducir la concentración de Km a 100 µg/ml

^b Estos antibióticos también se usaron con *A. tumefaciens*, a la misma concentración que las cepas de *Rhizobium*.

1.4. Preparación de las metilcetonas (MK) y las acil-homoserina lactonas (AHL).

Cuando se aplicaron en el medio de cultivo, las MK se diluyeron apropiadamente a partir de soluciones madre 1000 veces concentradas y preparadas en etanol. Para los tratamientos control se adicionó al medio 0,1% de etanol. Las soluciones madre se conservaron a -20 °C.

Para aplicarlas como volátiles, se añadieron a la tapa de la placa 20 µl de una solución preparada en etanol conteniendo la cantidad de MK deseada (por ejemplo, 20 µl de 2-TDC a 50 mM equivalen a 1 µmol de la MK). Como control se aplicaron 20 µl de etanol.

Para añadir al medio las AHL, se partió de soluciones madre preparadas a 10 mM, bien en dimetil sulfóxido (DMSO), bien en acetonitrilo (AcN), las cuales fueron diluidas apropiadamente. Como control se aplicó el mismo volumen de solvente. Las soluciones madre se conservaron a -20 °C.

1.5. Conservación de cepas bacterianas.

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

1.6. Conjugaciones biparentales.

Esta técnica se utilizó cuando fue necesaria la transferencia de un plásmido entre cepas bacterianas. Las conjugaciones se realizaron mezclando un cultivo en fase logarítmica de crecimiento del donador (D.O. 600 nm entre 0,6 y 0,7 para *E. coli* S17-1), con otro en fase exponencial tardía del receptor (D.O. 600 nm superior a 1), en proporción 1:1. Donador y receptor se precipitaron y se lavaron varias veces con medio líquido (el mismo usado para el crecimiento del cultivo) para eliminar restos de antibióticos. Finalmente, la mezcla se resuspendió en un pequeño volumen (30 µl) y se depositó sobre un filtro Millipore estéril de 0.45 µm de poro y 2,5 cm de diámetro, previamente colocado sobre una placa de medio TY sólido. La mezcla se incubó de este modo durante 16-20h a 28°C. Transcurrido este tiempo la mezcla de conjugación se resuspendió en medio líquido estéril, se lavó y se sembró sobre placas de medio selectivo.

1.7. Ensayos de movilidad bacteriana en superficie.

Para mantener la reproducibilidad del comportamiento en movilidad todos los cultivos líquidos rutinariamente partieron del stock de glicerol. Las cepas de *S. meliloti* se crecieron en agitación a 30 °C en medio TY líquido hasta una D.O. 600 nm de 0,9 - 1. Después de la incubación, las células se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con MM y se resuspendieron en este mismo medio en una décima parte del volumen inicial. Alícuotas de 2 µl de esta suspensión, se colocaron sobre la superficie de placas de Petri preparadas con 20 ml de MM conteniendo agar al 0.6% o al 1% y secadas durante 15 min a temperatura ambiente. Tras la colocación de las gotas, éstas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 min. Las placas se incubaron en posición invertida durante 24 ó 48 h.

Para la cuantificación de este tipo de movilidad, se procedió a medir la longitud de cada uno de los lados del teórico rectángulo que engloba a la colonia (en centímetros) y se realizó la media de esos valores. A los resultados obtenidos de un mínimo de tres experimentos independientes (con al menos 3 réplicas técnicas), se les aplicó el error estándar con un nivel de confianza del 95%.

1.8. Ensayos de movilidad *swimming*.

Las cepas de *S. meliloti* se crecieron en agitación a 30 °C en medio TY líquido hasta una D.O. 600 nm de 0.9 - 1. Después de la incubación, alícuotas de 3 µl del cultivo se colocaron sobre la superficie de placas de Petri preparadas con 25 ml de BM 0.3% de agar, secadas a temperatura ambiente tapadas. Tras la colocación de las gotas las placas se incubaron boca arriba durante 48 ó 72 horas.

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

1.9. Ensayos de formación de biopelículas.

1.9.1. Formación de biopelículas en cámaras sobre soporte de vidrio

Las cepas de *S. meliloti* marcadas con GFP se crecieron en MM con los correspondientes antibióticos hasta una D.O. 600nm de 1,5 - 2 (fase logarítmica tardía). Los cultivos se lavaron con MM y se diluyeron hasta D.O. 600nm de 0,2 en el mismo medio conteniendo 50 µM de 2-TDC o etanol como control.

A partir de esa suspensión final se inocularon 500 µl en cada cámara del *slide* y estos se incubaron durante 3 días a 30 °C en estático.

Previamente a la visualización, se retiró el sobrenadante de cada cámara mediante pipeteo, con precaución para evitar el desprendimiento de la biopelícula. Los biofilms se observaron en un microscopio láser confocal invertido Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Para cuantificar la masa de las biopelículas se evaluó la fluorescencia total emitida por cada biofilm, midiendo la intensidad de grises de las distintas imágenes generadas por el confocal mediante el software ImageJ (Abràmoff *et al.* 2004). Para obtener el valor medio de intensidad se analizaron al menos tres réplicas de cada muestra.

1.9.2. Formación de biopelículas en tubo de vidrio

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

1.10. Curvas de crecimiento.

Las curvas de crecimiento se realizaron en tubos de vidrio con 3 ml de medio de ensayo sin antibióticos. Se partió de una densidad celular inicial de 5×10^7 células/ml, diluyendo de un preinóculo de TY crecido con antibióticos hasta D.O. 600 nm = 1. En el caso de las curvas realizadas en un medio distinto al TY fue necesario lavar dos veces y después diluir el cultivo con el correspondiente medio de ensayo. La turbidez de los cultivos se determinó a intervalos regulares de tiempo en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

2. Técnicas de biología molecular.

2.1. Aislamiento de ADN plasmídico.

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

2.1.1. Mini preparación mediante lisis alcalina

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

1. Inocular la bacteria portadora del plásmido en 3 ml de medio suplementado con los correspondientes antibióticos e incubar a temperatura óptima (37 °C para *E. coli*, o 30 °C para *S. meliloti*) durante 12 - 15 horas.
2. Centrifugar las células en tubos de microfuga (12.000 rpm, 3 min). Retirar el sobrenadante.
3. En el caso de *S. meliloti*, resuspender el sedimento en 200 µl de sarkosyl 0,1% en TE, para eliminar restos de polisacáridos. Centrifugar las células (12.000 rpm, 3 min). Eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender el sedimento en 100 µl de solución I. Dejar 5 min a temperatura ambiente.
5. Añadir 200 µl de solución II. Mezclar por inversión rápida unas 3 veces. Dejar en hielo 5 min.
6. Añadir 150 µl de solución III fría. Mezclar suavemente por inversión manual varias veces. Dejar en hielo 5 min.
7. Centrifugar durante 5 min a 12.000 rpm.
8. Recoger el sobrenadante y adicionar 1 volumen (400 µl, aproximadamente) de una mezcla de fenol/cloroformo (1:1).
9. Agitar con vórtex y centrifugar 5 min a 12.000 rpm.
10. Recoger en un nuevo tubo la fase superior acuosa que contiene el ADN.
11. Añadir 2,5 volúmenes (1ml) de etanol al 100% pre enfriado a -20°C. Mezclar por inversión y dejar a -80°C al menos 30 min.
12. Centrifugar 15 min a 12.000 rpm.
13. Retirar el sobrenadante.
14. Añadir 200 µl de etanol 70% frío y centrifugar 3 min a 12.000 rpm. Eliminar el sobrenadante.
15. Secar el precipitado al vacío, 5-10 min, aproximadamente.
16. Resuspender el precipitado en 20 - 40 µl de tampón TE o H₂O milli-Q.
17. Conservar a -20°C.

Solución I:

Glucosa 50 mM
EDTA 10 mM
Tris-HCl 25 mM pH 8
Lisozima 4mg/ml

Solución II:

NaOH 0,2 M
SDS 1%

Solución III:

Acetato potásico 5 M (60 ml)
Ácido acético glacial (11,5 ml)
H₂O (28,5 ml); pH 4,5.

Tampón TE:

Tris 10 mM
EDTA 1 mM, pH 8.

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

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

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

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

13. Transferir la columna a un nuevo tubo, añadir 50-75 µl de solución de elución y centrifugar 1 minuto para recoger el ADN.

2.2. Aislamiento de ADN genómico total.

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

1. Crecer la cepa de *S. meliloti* en 3 ml de TY líquido adicionado de los correspondientes antibióticos hasta alcanzar una fase logarítmica media.
2. Repartir 1,5 ml del cultivo en tubos *ependorf* y centrifugar durante 2 min a 12.000 rpm.
3. Resuspender el sedimento en 200 µl de sarkosyl 0,1% en TE para eliminar restos de polisacáridos. Centrifugar las células (12.000 rpm, 3 min) y eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender las células en 1 ml NaCl 1 M y dejar la suspensión al menos 30 min a 4 °C, agitando de vez en cuando.
5. Centrifugar (12.000 rpm, 3 min), y eliminar el sobrenadante.
6. Resuspender el sedimento de células en 250 µl de una solución de sacarosa 20% en TE.
7. Añadir 250 µl de una solución en TE que contiene lisozima (5 mg/ml) y RNasa (1 mg/ml), agitar por inversión e incubar 30 min a 37 °C.
8. Adicionar 100 µl de una solución en TE que contiene sarkosyl 5% y pronasa (10 mg/ml) e incubar 1 hora a 37°C.
9. Añadir 70 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2, 200 µl de mezcla fenol-cloroformo (ver soluciones en apartado 2.1.1), y 200 µl de fenol (kirby mix). Agitar en vórtex durante 2 - 3 min.
10. Centrifugar (12.000 rpm, 5 min) y recoger la fase superior acuosa en otro tubo.
11. Añadir 300 µl de cloroformo, agitar y centrifugar (12.000 rpm, 3 min).
12. Recoger la fase superior en otro tubo *ependorf*, añadir 700 µl de isopropanol, agitar, y mantener a -80°C al menos 30 min.
13. Centrifugar 15 min a 12.000 rpm, y eliminar sobrenadante.
14. Añadir 300 µl de etanol 70%, centrifugar 3 min.
15. Eliminar sobrenadante y secar al vacío 5-10 min aproximadamente.
16. Resuspender en 100 µl de TE pH 8 diluido 1/10, e incubar 30 min a 65 °C.
17. Mantener el ADN a -20 °C.

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

Para la obtención de ARN total de *S. meliloti* se utilizó el RNase-free DNase kit de Quiagen. Se tomaron 12 alícuotas de 1,5 ml de cada cepa o condición a evaluar. Las células fueron centrifugadas y tras retirar el sobrenadante, lavadas con una solución de sarkosyl al 0,1% en tampón TE. A continuación el pellet celular fue congelado en nitrógeno líquido y guardado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

1. En el momento de su uso se descongelaron en hielo 4 viales de células por cada cepa o condición y se añadieron 100 μl de una solución de lizosima 4mg/ml en tampón TE, se mezcló mediante vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min.
2. A la muestra se añadieron 350 μl de tampón RTL al que previamente se le habían adicionado 10 $\mu\text{l/ml}$ de β -mercaptoetanol. Se mezcló por inversión manual y se centrifugó 5 min a 13.000 rpm para eliminar los restos celulares.
3. En el sobrenadante se añadieron 250 μl de etanol absoluto y se mezcló por inversión manual.
4. Por cada columna de purificación se pasaron 2 viales, centrifugando 30 seg a 13.000 rpm y eliminando el sobrenadante cada vez.
5. A continuación se lavó cada columna con 750 μl de solución RW1 y se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 seg.
6. Tras cambiar las columnas a nuevos tubos de recolección, se lavó la columna dos veces añadiendo 500 μl de buffer RPE y centrifugando a 13.000 rpm durante 30 seg.
7. Los restos de solución fueron eliminados centrifugando las columnas a 13.000 durante 2 min.
8. La columna de purificación se colocó en un nuevo tubo de microfuga y se añadieron 30 μl de H_2O libre de RNAsa. Se incubó durante 1 min a temperatura ambiente para hidratar la resina y se centrifugó 1 min a 13.000 rpm. Este paso se repitió, y se mezcló el ARN procedente de las dos extracciones realizadas para cada muestra hasta obtener un volumen final de 60 μl .
9. Al volumen total obtenido (120 μl) se añadieron 14 μl de solución buffer RDD (RNase free DNase set, Quiagen) y 6 μl de DNasa. La mezcla se incubó durante dos horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$.

10. A continuación a los 140 μ l de solución que contenían el ARN se añadieron 490 μ l de la solución RTL con β -mercaptoetanol, 350 μ l de etanol absoluto y se mezcló por inversión.
11. La solución se pasó por una columna RNeasy para retener el ARN (13.000 rpm durante 30 seg) y se continuó con su lavado.
12. La columna se lavó con 350 μ l de solución RW1 y se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 seg.
13. La columna se lavó dos veces añadiendo 500 μ l de buffer RPE centrifugando a 13.000 rpm durante 30 seg.
14. Los restos de solución fueron eliminados centrifugando las columnas a 13.000 durante 2 min.
15. Finalmente, se añadieron 25 μ l de agua RNase free sobre la resina de la columna. Esta se dejó hidratar por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugo durante 30 seg a 13.000 rpm. Este paso se repitió dos veces para obtener un volumen final de ARN de 50 μ l.

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

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

2.5. Estimación de la concentración de ADN y ARN.

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito por Sambrook *et al.* (1989).

La absorbancia (D.O. 260 nm y D.O. 280 nm) de las soluciones de ADN o ARN en agua o en TE se terminaron usando como blanco agua o TE, respectivamente.

La concentración se calculó respecto a los valores estándar de D.O. 260 nm = 1 para soluciones con 50 μ g/ml de ADN de cadena doble. En el caso de muestras de ARN se determinó su concentración a través de valores estándar de D.O. 260 nm = 1 en soluciones con 40 μ g/ml de ARN en espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Inc.).

Para estimar la pureza de muestras de ADN se tomó la relación D.O. 260 nm/D.O. 280 nm, considerándose valores inferiores a 1,8 como indicadores de contaminación por proteínas o fenol. Para muestras de ADN muy impuras o de baja concentración, se empleó el método de comparación de fluorescencia en gel de agarosa bajo luz UV frente a marcadores de ADN de concentración conocida, también descrito por Sambrook. En el caso de muestras de ARN se rechazaron aquellas muestras cuya relación D.O. 260 nm/D.O. 280 nm mostró valores inferiores a 2.0 por falta de pureza.

2.6. Manipulación del ADN.

2.6.1. Digestión total de ADN con endonucleasas de restricción

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

2.6.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La separación de fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 0,8% sumergidos en tampón de electroforesis TBE (Tris 50 mM; EDTA-Na₂ 2,5 mM; BO₃H₂ 50 mM; pH 8.2). El voltaje usual de trabajo fue 90 - 95 V en cubetas de electroforesis Wide mini-sub® cell GT o Mini-sub® cell GT (BioRad). Como tampón de carga se utilizó una mezcla de sacarosa al 40% y azul de bromofenol al 0,25%, ambos preparados en agua destilada.

2.6.3. Revelado de geles y fotografía

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

2.6.4. Estimación del tamaño molecular de los fragmentos de ADN

La determinación del tamaño molecular de los fragmentos de restricción se ha efectuado mediante la construcción de gráficas en las que se representa el logaritmo de tamaño molecular relativo de moléculas patrón de ADN frente a la movilidad relativa (Rf) de las mismas en el gel de agarosa. Como marcadores de tamaño molecular se han utilizado los fragmentos de restricción del ADN del fago lambda resultantes de la digestión con *Hind*III (Marcador II), o *Eco*RI/*Hind*III (Marcador III), ambos de Roche. También se ha utilizado el marcador de 100 pb GeneRuler (Fermentas).

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

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

El proceso de electroelución se llevó a cabo con los siguientes pasos:

1. Cortar del gel de agarosa el fragmento que contiene el ADN de interés, e introducirlo en el tubo de diálisis sellado previamente en uno de sus extremos con una pinza.
2. Añadir 500 µl de TBE y cerrar el otro extremo del tubo con una segunda pinza, intentando no dejar grandes burbujas de aire.
3. Colocar la bolsa de diálisis en una cubeta de electroforesis, y aplicar un voltaje de 120 voltios durante 20 min.
4. Invertir la polaridad durante 1 minuto y comprobar con el uso de luz UV que no queda ADN en el fragmento de agarosa.
5. Recoger la solución de TBE con el ADN y colocarla en un tubo eppendorf.
6. Precipitar el ADN añadiendo 50 µl de acetato sódico 3 M pH 5,2, y 2 volúmenes de etanol 100% (1 ml).
7. Agitar por inversión y dejar 20 min a -80°C

8. Centrifugar 15 min a 12.000 rpm y eliminar el sobrenadante.
9. Lavar con etanol 70% (200µl). Secar el precipitado al vacío. Resuspender en 20 µl de agua Milli-Q o TE.

2.6.6. Ligación de fragmentos de restricción en vectores de clonación

En un tubo *ependorf*, adicionar:

- x µl de ADN vector*
- y µl de ADN inserto*
- 1 µl de ADN ligasa del fago T4 (1 unidad/µl)
- 2 µl de tampón de la ligasa (concentrado 10x)
- H₂O milli-Q, completar hasta 20 µl.

Los componentes se mezclan suavemente y la reacción se incuba a 15 °C durante toda la noche.

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

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

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

1. Inocular la cepa de *E. coli* en 3 ml de LB líquido e incubar a 37 °C 12 - 15 h.
2. Diluir 1 ml del cultivo anterior en 100 ml de LB líquido preparado previamente en un matraz de 250 ml. Incubar a 37 °C hasta alcanzar una D.O. 600 nm de 0.5 (aproximadamente 2 horas).
3. Dejar en hielo 10 min.
4. Centrifugar a 6.000 xg, 10 min a 4°C y eliminar el sobrenadante.
5. Resuspender las células en 1 volumen de una solución MgCl₂ 0,1 M estéril y preenfriada a 4 °C.
6. Centrifugar a 3.000 xg, 5 min a 4 °C y eliminar el sobrenadante.
7. Resuspender el precipitado de células en 1/2 volumen de una solución de CaCl₂ 0,1 M estéril y preenfriada a 4 °C.
8. Dejar las células en hielo durante al menos 30 min.
9. Centrifugar a 3.000 xg, 5 min a 4 °C, y retirar cuidadosamente el sobrenadante.

10. Finalmente, resuspender suavemente las células en 1/10 volumen de una solución estéril de CaCl_2 0,1 M conteniendo glicerol al 20% (p/v) preenfriada a 4 °C.
11. Repartir las células en alícuotas de 200 μl en tubos eppendorf preenfriados en hielo.
12. Conservar a -80 °C. La competencia de las células se mantuvo de esta forma durante varios meses.

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

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

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

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

2.9. Experimentos de hibridación ADN-ADN.

2.9.1. Transferencia de ADN a filtros de nylon

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

1. Realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. La concentración de agarosa puede variar según el tamaño de los fragmentos que se quieran separar. Es conveniente emplear un voltaje bajo cuando se quiera transferir ADN total digerido con alguna enzima de restricción.
2. Tinción del gel con GelRed™ (Biotium) y fotografía del mismo.
3. Depuración ácida del ADN: sumergir el gel en HCl 0,25 M hasta viraje del azul de bromofenol a amarillo (20 min). Lavar con agua destilada 3 veces.
4. Desnaturalización alcalina del ADN: sumergir el gel durante 20 min en una solución NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M. Repetir el proceso. Lavar el gel con agua destilada.
5. Neutralización del ADN: sumergir el gel en una solución Tris-HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M (pH: 7,4) durante 15 min dos veces. Retirar la solución y lavar con agua destilada.
6. Humedecer una membrana de nylon (Roche®), cargada positivamente, en SSC 10x durante al menos 5 min. El tamaño de la membrana debe ser igual al del gel. Recortar también dos piezas de papel Whatman 3 mm del mismo tamaño y otra de mayor tamaño que el gel, y saturarlas en tampón SSC 10x.
7. Sobre una superficie regular, habitualmente un cristal, construir una unidad de transferencia compuesta, de abajo hacia arriba, por:
 - Una pieza de papel Whatman 3 mm, cuyos extremos, a modo de mecha se sumergen en un reservorio de tampón de transferencia SSC 10x.
 - El gel, el filtro de nylon y las dos piezas restantes de papel Whatman 3 mm.
 - Colocar un marco de plástico que bordeé todo el sistema y, a continuación, cubrir con papel absorbente.
 - Sobre todo el conjunto se coloca una placa de vidrio y, sobre ésta, un peso de aprox. 0,5-1 Kg para mantener el sistema ligeramente comprimido.
8. Comprobar que el sistema está perfectamente horizontal, y dejar la transferencia toda la noche.
9. Finalizado el proceso, lavar la membrana con SSC 2x durante 5 min.
10. Dejar secar la membrana a temperatura ambiente durante 30 min y finalmente fijar el ADN a la membrana mediante calentamiento en vacío, a 120 °C durante 30 min.

Solución SSC 20X:

175,3 g de NaCl

8,2 g de citrato sódico

800 ml de H₂O destilada. Ajustar el pH a 7,0 y completar hasta 1 litro.**2.9.2. Marcaje de sondas de ADN no radioactivas**

El marcaje de sondas de ADN se ha realizado empleando el sistema no radioactivo comercializado por Roche®, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Esta técnica consiste en la síntesis parcial de ADN a partir del ADN molde que se quiere usar como sonda. Para ello, se utiliza el ADN molde desnaturalizado por calor (100 °C, 10 min) y enfriado en agua/hielo durante 2 min, una mezcla de hexanucleótidos, el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y una mezcla de dNTPs que incluye dUTP marcado con digoxigenina, nucleótido que se puede detectar mediante reacción inmunológica específica.

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

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

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

1. Prehibridación: mantener la membrana de nylon inmersa en 30 ml de solución de prehibridación durante al menos 2 horas, a 42 °C.
2. Hibridación: tras eliminar la solución de prehibridación, adicionar nueva solución de prehibridación con el ADN sonda (100 mg/ml solución) previamente desnaturalizado por calor (100°C, 10 min) y enfriado en agua/hielo durante otros 2 min. Incubar durante al menos 6 horas a 42°C.
3. Tras la hibridación, se realizaron los siguientes lavados:
 - 2 x 5 min en 100 ml de SSC 2x : SDS 0,1% a temperatura ambiente
 - 2 x 15 min en 100 ml de SSC 0.1x : SDS 0.1% a 68 °C.
4. Lavar 1 - 5 min en tampón I.
5. Incubar 30 min en tampón II.
6. Detección inmunológica: incubar durante 30 min con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) diluidos 1:10.000 en tampón II.

7. Lavar (2 x 15 min) con tampón de lavado, formado por tampón I + Tween 20 al 0,1%.
8. Incubar 5 min con tampón III.
9. Incubar la membrana 5 min en 10 ml de CSPD (Roche) (1:100 en tampón III), evitando incidencia de la luz.
10. Envolver la membrana en plástico transparente e incubar a 37 °C durante 15 min.
11. Exponer la membrana a una película autorradiográfica (Kodak X-Omat®). El tiempo de exposición (30 min a 6 h) varía en función de la concentración de ADN, el porcentaje de homología entre los ADNs sonda y problema y la eficiencia del marcaje.
12. Para el revelado de las películas se emplearon el revelador y el fijador de TETENAL® a las diluciones y tiempos recomendados por las casas comerciales.

Solución de prehibridación:

SSC 5x
Formamida 50%
Reactivo de bloqueo 2% (p/v) (Roche)
N-lauryl-sarcosina 0.1%
SDS 0,02%

Tampón I:

Tris-HCl 100 mM (pH 7.5)
NaCl 150 mM

Tampón II:

Tampón I
Reactivo de bloqueo 1%

Tampón III:

Tris-HCl 100 mM (pH 9.5)
NaCl 100 mM

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

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la técnica de PCR se llevó a cabo preparando una mezcla de reacción con tampón de PCR (10X), MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, 50 pmoles de cada cebador, 10 - 50 ng de ADN molde y 2,5 unidades de EuroTaq (EuroClone) en un volumen final de 50 µl.

Para el proceso se utilizó un termociclador Thermo (Electron Corporation) con un programa básico que consistió en un ciclo de desnaturalización a 94 °C de 5 min, 30 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización (94 °C, 1 min), apareamiento del cebador (55-58 °C dependiendo de la secuencia del cebador, 1 min) y extensión (72 °C, 1 - 4 min según la longitud del fragmento a amplificar) y finalmente un último ciclo de extensión (72°C, 10 min). Los cebadores empleados en este trabajo se describen en la Tabla M4.

Tabla M4: Cebadores empleados para PCR.

Oligo	Secuencia (5'→3') ^a	Uso
Universal	GTAAAACGACGGCCAGT	Secuenciación
Reverso	GAAACAGCTATGACCATG	(TOPO, pUC)
IS50(1)	CACGATGAAGAGCAGAAG	Mapeo inserción
IS50(2)	TAGGAGGTCACATGGAAGTCAGAT	
ARB2	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	Tn5
ARB6	GGCCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNACGCC	
Tn5lux	AGCCGGATCCCCGGGTAC	Mapeo inserción Tn5lux
delntrYX.1	AAAGGATCCATCATCGAGAACGAAGTGGC (<i>Bam</i> HI)	Construcción pJB3- ntrYX
delntrYX.4	AAAGGATCCACCGTGCTGTTGAGCTTGTC (<i>Bam</i> HI)	
visNR-U	AAAAGATCTGATTAGCGAATTGGTGGC (<i>Bgl</i> II)	Construcción pTE3- visNR
visNR-R	AAAAGATCTAAGAGCCTGGCAGAATCG (<i>Bgl</i> II)	
pnor.F	AATGAATTCTACACTAAGCGAAGGCTGC (<i>Eco</i> RI)	Construcción pMP- Smnor
pnor.R	AAAGAATTCCACGCCAAAGAGGATCTGG (<i>Eco</i> RI)	
pnirK.F	AATGAATTCTTCAGATCCTTCCACTTGC (<i>Eco</i> RI)	Construcción pMP- Smnir
pnirK.R	AATGAATTCCGATGCGACGTTGATGTGG (<i>Eco</i> RI)	
delntrY.1	AAAGGATCCCTATCGCCTGAATGTCGTGC (<i>Bam</i> HI)	Delección <i>ntrY</i>
delntrY.2	GGTCCTCTATGATCCCATTCCATCCACC	
delntrY.3	GGTGGATGGAATGGGATCATAGAGGACC	
delntrY.4	AAAGGATCCCACCTTTCTCGATCATCTGGC (<i>Bam</i> HI)	
Pb46-F	TTTAAGCTTTTCGAGAAACATATCAGCCG (<i>Hind</i> III)	Fusión <i>smb20346::mCherry</i>
Pb46-R	TAATCTAGAACTTCTGAAAACATCGC (<i>Xba</i> I)	
Pb47-F	TTAAAGCTTGTCTTGCCCGCCTCGCTC (<i>Hind</i> III)	Fusión <i>smb20347::mCherry</i>
Pb47-R	TATTCTAGAGTTGTCTGCGAGATCGCTC (<i>Xba</i> I)	
20345i-F	AATTCTAGATTTCTCCAAGGTCCTCG (<i>Xba</i> I)	Construcción de pK20345i
20345i-R	ATAGGTACCAGCTCGTACATGATCGC (<i>Kpn</i> I)	
20345c-F	AATTCTAGATTCTCCGCTAACCTCCAC (<i>Xba</i> I)	Construcción de pWBT20345
20345c-R	ATAGGTACCACCTTACTCTGCCGCAAGC (<i>Kpn</i> I)	

^a Las dianas de restricción están subrayadas y las enzimas correspondientes se indican entre paréntesis

2.11. Amplificación de ADN mediante PCR arbitraria.

Esta estrategia se empleó para determinar el sitio de inserción del Tn5 de los mutantes aislados en este trabajo. Se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones de Miller-Williams y colaboradores (2006).

Como ADN molde se usó el ADN total (50 ng) de las distintas cepas de *S. meliloti*, obtenido como se describe en el apartado 2.2 de esta sección.

Primeramente se realizó una reacción de PCR de baja astringencia usando los oligos IS50(1) y ARB6 (Tabla M4). El programa empleado para la amplificación consistió en una primera etapa de desnaturalización de 5 minutos a 94 °C. Ésta se continuó con 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, 45 segundos de anillamiento a 45 °C seguido por 2 minutos de extensión a 72 °C. Por último, se llevó a cabo un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

A continuación se llevó a cabo una PCR de alta astringencia usando como ADN molde 0,5 µl del producto de la primera PCR y los oligos IS50(2) y ARB2 (Tabla M4). En este caso, el programa desarrollado consistió en una primera etapa de desnaturalización de 5 minutos a 94°C. Ésta se continuó con 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, 30 segundos de anillamiento a 60 °C seguido por 2 minutos de extensión a 72 °C. Por último, se llevó a cabo un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

2.12. Mutagénesis *in vitro* por delección mediante PCR solapante.

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

Para la amplificación de las regiones de ADN que flanquean a derecha o izquierda la delección deseada, se llevó a cabo una reacción de PCR utilizando 10 ng de ADN genómico de *Rhizobium* como ADN molde, tampón PCR Phusion HF (5X), dNTPs 200 µM, 1,0 unidad de DNA Phusion (polimerasa usada en lugar de EuroTaq polimerasa de EuroClone para evitar generar mutaciones no deseadas aguas arriba o abajo del gen por errores de la polimerasa), 25 pmoles de los cebadores correspondientes al fragmento a amplificar (Tabla M4) y completando con agua desionizada hasta un volumen de 50 µl.

Dicho proceso se llevó a cabo mediante un termociclador Thermo (Electron Corporation) con un programa básico consistente en un ciclo de desnaturalización a 98 °C durante 1 min, 30 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización (98 °C, 10 seg), apareamiento del cebador (57-60 °C dependiendo de la secuencia de los cebadores, 30 seg) y extensión (72 °C, 30 seg por cada kb a amplificar).

Para obtener el producto de fusión, se realizó una segunda reacción de PCR utilizando 2 ng de cada uno de los flancos obtenidos previamente. El producto de fusión tiene un

tamaño que oscila entre 1.4-1.5 kb con aproximadamente 700 pb correspondientes a cada flanco.

2.13. Secuenciación automática de ADN de doble cadena.

Las reacciones de secuenciación se realizaron en un termociclador Perkin Elmer 9.600, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la polimerasa Amplitaq FS, por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra y el de la Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.

La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos. Al ADN a secuenciar (0.4 - 1 µg) se le adicionó el cebador específico (6.4 picomoles) y agua Milli Q hasta un volumen final de 12 µl.

2.14. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas.

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

2.15. Experimentos de *microarrays*.

2.15.1. Reversotranscripción del ARN

1. Se tomaron 15 µg de ARN total de *S. meliloti* concentrado y se llevaron a un volumen final de 13 µl con agua libre de RNasa. Se añadieron 2 µl de una mezcla de hexanucleótidos (5 µg/µl) y se incubó a 70 °C durante 10 min.
2. A continuación se dejó enfriar en hielo durante 5 min y se añadieron 6 µl de solución 5xRT (Stratagene), 3 µl de solución 0,1 M de DTT (Stratagene), 0,5 µl de inhibidor de RNasa (40 U/µl), 1,5 µl de reverso transcriptasa (Superscript II,

Stratagene) y 0,6 µl de una solución madre de dNTPs que incluía dUTP amino modificado (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 5 mM dTTP, y 20 mM aa-dUTP). Los componentes de la reacción se mezclaron y se mantuvieron durante una hora a 42 °C.

3. Transcurrido este tiempo se añadió 1 µl más de reverso transcriptasa (Superscript II, Stratagene) y se dejó transcurrir la reacción durante otra hora hasta la obtención de la muestra final de ADNc.

2.15.2. Hidrólisis de ARN

1. Se adicionaron a la muestra 15 µl de NaOH 0,2 M, se mezcló bien y se incubó a 70 °C durante 10 min.
2. A continuación se neutralizó el pH añadiendo 15 µl de HCl 0,2 M y se procedió a limpiar el cDNA utilizando columnas CyScribe GFX (Amsterdam Biosciences). Para ello se mezcló la muestra con 450 µl de tampón de captura, esta fue puesta en columna CyScribe GFX y se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 seg.
3. La columna se lavó dos veces con 600 µl de etanol al 80% y se centrifugó una vez más a 13.000 rpm durante 10 seg para eliminar restos de líquido.
4. La columna fue colocada en un nuevo tubo contenedor, se añadieron 60 µl de NaCO₃ 0,1 M a pH y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Para recuperar el cDNA se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min. A continuación se procedió con el marcaje del cDNA.

2.15.3. Marcaje del ADNc

El ADNc se marcó utilizando como fluoróforo Cy3 para la muestra o condiciones control y Cy5 para la muestra o condición problema. Tanto los fluoróforos como las muestras marcadas se mantuvieron protegidos de la luz a lo largo de todo el proceso.

1. Los fluoróforos de Amersham se disolvieron en 10 µl de DMSO (es importante que el DMSO no contenga agua) y se separaron 10 alícuotas de 1 µl del fluoróforo que se desecaron en "Speed-vac" y se conservaron a -20 °C en bolsas selladas con un paquete de sílica gel para evitar su hidratación.
2. Para llevar a cabo la reacción de marcaje, se transfirió la muestra a un microtubo con una alícuota del fluoróforo correspondiente y se resuspendió

pipeteando. Alternativamente se puede añadir 1 µl del fluoróforo recién resuspendido en DMSO y pipetear hasta obtener una suspensión homogénea. Se dejaron transcurrir 2 horas manteniendo la suspensión a temperatura ambiente en oscuridad.

3. A continuación se procedió a neutralizar los fluoróforos que pudieran haber quedado libres añadiendo 4.5 µl de hidroxilamina 4 M, mezclando suavemente y dejando la mezcla 15 min más a temperatura ambiente en oscuridad.
4. Las muestras marcadas con Cy3 y Cy5 que constituían una sonda se mezclaron en este momento y se purificaron juntas utilizando el CyScribe GFX Purification Kit (Amersham Biosciences) según las instrucciones del fabricante. La muestra marcada con Cy5 se mezcló con 600 µl de solución de captura y luego se añadió la muestra marcada con Cy3.
5. Tras pipetear repetidas veces para obtener una mezcla homogénea, ésta se aplicó a una columna CyScribe GFX. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 30 seg para eliminar restos de líquido.
6. La columna fue lavada tres veces con 600 µl de buffer de lavado, centrifugando durante 30 seg a a 13.000 rpm.
7. La columna se centrifugó 30 seg más para eliminar los restos de líquido.
8. La columna fue colocada en un nuevo microtubo oscuro y se añadieron 60 µl de solución de elución. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y luego se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 min para recuperar el cDNA marcado. El cDNA marcado de esta forma puede mantenerse a -20 °C hasta el momento de su utilización.

2.15.4. Procesamiento del *microarray* previo a la hibridación

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

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

2.15.5. Hibridación de los *microarrays*

Las muestras de ADNc marcado se desecaron utilizando un “Speed-vac” y se resuspendieron en 45 μ l de DIG Easy Hyb pipeteando varias veces y se incubó a 65°C durante 5 – 10 min.

Los cristales pretratados según las instrucciones del apartado 2.14.4 se colocaron a 42°C en las cámaras de hibridación para evitar las posibles precipitaciones debidas a gradientes térmicos.

La sonda se aplicó como una gota sobre el cristal y se colocó el cubre objetos de modo que no quedaran burbujas.

La incubación se llevó a cabo en un incubador Thermomixer confort (Thermomixer confort, Eppendorf) a 42 °C durante 14 – 18 h.

2.15.6. Procesamiento del *microarray* tras la hibridación

Transcurrido el tiempo de hibridación, los cristales se lavaron primero con una solución 2x SSC y SDS al 0,1% (p/v) durante 1 min a temperatura ambiente, otras dos veces con una solución 0,2x SSC durante 1 min a temperatura ambiente y finalmente una vez con una solución 0,1x SSC preenfriada a 18 °C durante 1 min.

Por último, los cristales se secaron por centrifugación a 1.200 rpm durante 5 min a 4°C y se dejaron a temperatura ambiente un mínimo de 20 min más antes de

escanearlos. Durante todo el proceso los cristales se mantuvieron en oscuridad en la medida de lo posible.

2.15.7. Adquisición de la imagen y tratamiento de los datos

Se utilizó un escáner confocal (ScanArray4000) para la obtención de las imágenes correspondientes a la utilización de los láseres de 555 nm y 647 nm para detección de la fluorescencia de Cy3 y Cy5, respectivamente.

Para la obtención de los datos se utilizó el programa ImaGene 5.5. (Biodiscovery Inc. Los Angeles, Calif., USA), que determinó la intensidad de los distintos puntos impresos en el cristal así como la intensidad del fondo asociado a cada punto y la calidad del punto (según su forma, tamaño, intensidad respecto al fondo).

Se obtuvo el valor del \log_2 de la relación entre las intensidades detectadas de cada fluoróforo para cada punto (M) mediante la fórmula: $M_i = \log_2 (R_i/G_i)$, siendo $R_i = I_{ch1i} - B_{gch1i}$ y $G_i = I_{ch2i} - B_{gch2i}$ (I_{ch1i} o I_{ch2i} es la intensidad de un punto en el canal 1 o el 2, respectivamente). También se calculó la intensidad media para cada punto (A) según la fórmula $A_i = \log_2 (R_i/G_i) \cdot 0.5$. Cada experimento se llevó a cabo por triplicado.

Para la normalización de los datos y el análisis estadístico de las réplicas se utilizó el programa EMMA1.1 (Dondrup *et al.* 2003) con el que se obtuvieron los correspondientes valores de M y A una vez normalizados y promediados en las réplicas con una calidad aceptable (n) junto con el valor de fidelidad de estos datos (p) según una *t* de Student. Se consideraron como diferencialmente expresados aquellos genes para los que $n \geq 5$, $P \leq 0.05$, $A \geq 9$ y $M \geq 1$ o $M \leq -1$ (es decir, si su expresión variaba cuatro veces como mínimo entre ambas condiciones experimentales) en al menos 2 de los 16 experimentos que se llevaron a cabo.

2.16. RT- qPCR (*Reverse transcription quantitative real-time PCR*).

2.16.1. Síntesis de ADNc para RT-qPCR

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

1. Se mezclaron 1 μ g de ARN total, 1 μ l de una solución conteniendo 100 ng/ μ l de una mezcla de oligonucleótidos (Random Primers, Roche), 1 μ l de una mezcla 10 mM de dNTP y se completó el volumen hasta 12 μ l con agua milliQ.

2. La muestra fue incubada a 65 °C durante 5 min y transferida inmediatamente a hielo.
3. Se añadieron 5 µl de tampón de síntesis 5x (First-strand, Invitrogen), 2 µl de 0,1 M DTT y 1 µl de inhibidor de ARNasa (40 U/µl, Protector RNase inhibitor. Roche).
4. La mezcla se incubó a 25 °C durante 2 min, se añadió 1 µl de reverso transcriptasa (Superscript II reverse transcriptase, 200 U/µl, Invitrogen) y se incubó a 25 °C durante 10 min para la unión de los cebadores y, posteriormente, 50 min a 42 °C para la síntesis de ADNc.
5. Finalmente para inactivar el enzima y parar la reacción se sometió a la mezcla a 65 °C durante 10 min.

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

La amplificación de los fragmentos de ADNc para la cuantificación de los niveles de ARN mensajero se realizó utilizando Platinum Taq ADN polimerasa de Invitrogen. Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador IQ de BIORAD.

La mezcla para la reacción contenía: 1 µg de ARN reverso transcrito (ADNc), 0,2 µM de los primers específicos del gen a estudiar, 0,2 mM de mezcla de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, solución de SYBR Green I 0,1x platinum Taq ADN polimerasa (1 – 2,5 U).

El programa estándar de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, precedido de 35 ciclos de amplificación y cuantificación de 30 seg a 95 °C, 45 seg, a 55 °C y 45 seg a 72 °C. A continuación se llevaron a cabo 1 ciclo de 1 min a 95 °C, otro ciclo de 1 min a 70 °C y 90 ciclos de 10 seg a 55 °C.

Terminada la reacción se realizó un análisis de la curva de Melting o curva de fusión para la determinación de la formación de productos específicos. En la tabla M5 se pueden observar los *primers* utilizados en RT-qPCR en este trabajo.

Tabla M5: Cebadores usados para RT-qPCR

Oligo	Secuencia (5'→3')	Uso
flaA.1 flaA.2	CGATTATGTCAAGGTCCA GCAATGGTGATGTCGATC	Cuantificación de la expresión de <i>flaA</i>
visN-F visN-R	TCCTTGATGCTGCTCTTC CTCGGTCAGTTCGCATTC	Cuantificación de la expresión de <i>visN</i>
exoY.A exoY.B	CGCAGTTTTGACGTTCTTGC TCAGGCACTTGAAGGATTGG	Cuantificación de la expresión de <i>exoY</i>
ntrX.F ntrX.R	ACAGCCGTATCATGATCCAG TTGAGAGCCACGAAAGGACC	Cuantificación de la expresión de <i>ntrX</i>
ntrYUT.F ntrYUT.R	CCATCTTCAATCCGTCTTCG TCTGCTTGCGGTAATCGTTG	Cuantificación del nivel de transcripción de las secuencias de <i>ntrY</i> aguas arriba del Tn5
ntrYDT.F ntrYDT.R	TGAAGGACGCCGTATTCC GACGAGATTGCCGAATGC	Cuantificación del nivel de transcripción de las secuencias de <i>ntrY</i> aguas abajo del Tn5
SMc03224-F SMc03224-R	TCTACGGAATAACGCAGG GTGTCTCAGTCCCAATGT	Cuantificación de la expresión del gen <i>smc03224</i> (ARN _r 16S)

2.16.3. Cálculo de la eficiencia de los oligonucleótidos para RT-qPCR

Se empleó el método recomendado por el fabricante del termociclador, basado a su vez en el método de Pfaffl (2001), a través del programa iCycler iQ5 de BioRad.

A partir de una muestra de ADN de concentración conocida se realizan diluciones seriadas (factor de dilución = 10) con el fin de construir una recta patrón en la que se enfrentan el valor de Ct frente al logaritmo de la cantidad de ADN para cada muestra diluida. La eficiencia se calcula a partir de la pendiente de la recta patrón utilizando la fórmula:

$$E = 10^{(-1/a)} - 1$$

E = eficiencia de los oligonucleótidos
a = pendiente de la recta patrón

En condiciones ideales el valor máximo de E es igual a 1 (eficiencia del 100%). Para obtener resultados robustos, se considera que una pareja de cebadores ha de tener una eficiencia de entre el 85 al 100%.

Para el diseño de parejas de oligonucleótidos lo más eficientes posible se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

- Longitud de 18 – 20 nucleótidos.
- Temperatura de fusión (T_m) de 61 °C aproximadamente.
- Contenido en G+C entre el 50 y el 60%.
- Tamaño del amplicón dentro del rango de 100 – 200 pb.

- Evitar que los cebadores tuvieran interacciones estables entre ellos o entre sí mismos (estructuras secundarias).
- Evitar que los amplicones formasen estructuras secundarias estables en las condiciones de PCR utilizadas.

2.16.4. Cálculo de las expresiones relativas

El cálculo de la expresión relativa a partir de los datos de la PCR en tiempo real se hizo mediante el método delta-delta ($\Delta\Delta$) de Pfaffl (2001). Después de la reversotranscripción se amplificaron por PCR cuantitativa el gen de estudio y el gen de referencia (gen para el ARN ribosomal 16S). Tras determinar el valor de Ct para cada uno se aplicó la siguiente fórmula:

$$ER = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3. Ensayos con plantas.

3.1. Ensayos con plantas de alfalfa.

3.1.1. Esterilización y germinación de semillas

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

1. Sumergir las semillas de alfalfa, en HgCl₂ al 2,5% durante 9 min y medio.
2. Lavar 5 - 6 veces con abundante agua desionizada estéril. Dejar en imbibición durante 2 horas.
3. Lavar 2 - 3 veces con abundante agua desionizada estéril.
4. Colocarlas las semillas bien separadas y en condiciones asépticas en placas Petri que contienen papel de filtro humedecido con agua desionizada estéril.
5. Germinar en oscuridad a 28 °C durante aproximadamente 24 horas.

3.1.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas

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

Macroelementos (por litro de agua):

KH_2PO_4 , 68 mg

K_2HPO_4 , 44 mg

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

K_2SO_4 , 174 mg

CaSO_4 , 173 mg

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

Microelementos (por litro de agua):

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

BO_3H_3 , 2,85 mg

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

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

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

El pH de la solución se ajustó a 7,5. La solución se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

3.1.3. Cultivo axénico de plantas

El cultivo axénico de plantas de alfalfa se realizó según la técnica descrita por Olivares y colaboradores (1980).

Cuando las plántulas recién germinadas alcanzaron 1 - 2 cm de longitud, se colocaron en condiciones asépticas en tubos de 20x200 mm conteniendo 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro. Se dejaron los tubos con las plantas en oscuridad durante dos días. Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, los tubos se cubrieron en su mitad inferior con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas, mantenida en las siguientes condiciones: 500 $\mu\text{einsteins} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (longitud de onda: 400 - 700 nm) de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, 24/17 °C de temperatura día/noche y 50% de humedad relativa.

3.1.4. Medida del grado de infectividad

Cuando las plantas tienen aproximadamente 9 días, se inoculan con 1 ml de una suspensión celular de aprox. 5×10^6 células/ml de la cepa en estudio. Al menos 20

plantas individuales (1 planta/tubo) se inoculan con cada cepa. Tras la inoculación se registró diariamente el número de plantas noduladas y el número de nódulos formados en cada planta. Se consideró que una planta estaba nodulada cuando en sus raíces existía al menos un nódulo visible. El seguimiento de la nodulación se continuó hasta que todas las plantas estuvieron noduladas. La infectividad de la cepa se considera en función del tiempo de nodulación y del número de nódulos que forma.

Cuando sólo se quiso evaluar la fijación simbiótica de nitrógeno las plantas de alfalfa se crecieron en jarras Leonard. Se colocaron 10 semillas germinadas por cada jarra, que se inocularon de la misma manera que en cultivo hidropónico con las cepas de estudio.

Un mes después de la inoculación se comparó la apariencia y el peso seco de la parte aérea de las plantas, así como también el número de nódulos y el aspecto de los mismos.

3.1.5. Experimentos de adsorción – colonización

La medida de la capacidad de adhesión de distintas cepas de *S. meliloti* a las raíces de alfalfa se hizo de la siguiente manera:

1. Tras la germinación, se colocaron cinco semillas por cada tubo conteniendo solución mineral nutritiva.
2. Una semana después se inocularon los tubos con las cepas de *S. meliloti* a ensayar, tal y como se explica en el apartado anterior.
3. A distintos tiempos se sacaron 15 plantas (3 tubos) de cada cepa y las raíces de dichas plantas se lavaron tres veces con agua destilada estéril en tubos separados, uno para cada *pool* de raíces, y se sumergieron en tubos *eppendorf* conteniendo 1 ml de tampón TE estéril.
4. Los tubos se sonicaron con dos pulsos de un minuto cada uno en un baño de ultrasonidos Selecta Ultrasons.
5. Las bacterias desprendidas tras los pulsos de ultrasonidos se cuantificaron mediante siembra en placa de diluciones seriadas del sobrenadante. Para cada cepa de estudio se determinó el número de UFC por gramo de peso fresco de raíz.

3.1.6. Medida del grado de competitividad

La determinación del número de nódulos que una cepa es capaz de formar en presencia de otra se hizo mediante coinoculación de la cepa de interés con su correspondiente cepa parental, en nuestro caso GR4, marcada con el plásmido pGUS3 (expresa constitutivamente el gen reportero *gusA*, que codifica la β -glucuronidasa).

Las semillas se desinfectaron y germinaron como se ha descrito anteriormente. Cuando las plantas tenían 9 días, se inocularon al menos 12 de ellas (1 planta/tubo) con 1 ml de una suspensión bacteriana que contenía mezclas en proporción 1:1 ó 10:1 de la cepa a analizar y la cepa GR4 (pGUS3).

Quince días después de la inoculación se cortaron las raíces, se aclararon con agua destilada entre 10 - 15 minutos y se mantuvieron sumergidas en 5 mL de una solución de X-Gluc (21mg/40mL) en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 y SDS al 1%, durante 14 - 16 horas a 37 °C en oscuridad.

Pasado este tiempo, los nódulos ocupados por GR4 (pGUS3) o por ambas cepas aparecieron teñidos de azul, mientras que aquellos ocupados exclusivamente por la cepa de interés permanecieron blancos. Se pudo establecer así la relación entre la capacidad de ocupación de los nódulos de la cepa de estudio y su parental con respecto a la GR4 (pGUS3), comparando el porcentaje de ocupación de la cepa parental en la mezcla control (GR4 vs. GR4 (pGUS3)) con el de la cepa de estudio (cepa problema vs. GR4 (pGUS3)).

3.2. Ensayos con plantas de tomate

Los ensayos de infección con *P. syringae* Pto DC3000 se realizaron en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* cv. MoneyMaker) de cuatro o cinco semanas de edad y cultivadas en una cámara de crecimiento bajo condiciones de luz, humedad y temperatura controladas; fotoperiodo de día largo (16/8 h luz/oscuridad; 24/18 °C día/noche) y una humedad relativa del 60%.

3.2.1. Preparación del inóculo

Se tomó un inóculo de células de *P. syringae* Pto DC3000 cultivadas durante 48 h a 28 °C en placa de LB y se resuspendió en MgCl₂ 10 mM. La suspensión se lavó dos

veces con dicha solución, tras lo cual se procedió a ajustar la densidad celular a D.O. 660nm = 0,3-0,4 (correspondiente a 10^8 UFC/ml). A esta suspensión bacteriana final se le añadió 2-TDC 50 ó 500 μ M, o etanol 0,1% como control.

3.2.2. Ensayo de infección individual

Las plantas de tomate cultivadas durante el tiempo establecido se inocularon con cada una de las tres suspensiones bacterianas (4 plantas por tratamiento) aplicando el inóculo por aspersión (3 veces por el haz y 3 veces por el envés).

El análisis de la evolución de los síntomas y la toma de muestras se realizó a las 3 h tras la inoculación ($t = 0$) y a los 3, 6 y 10 días tras la inoculación. Para determinar el número de UFC, se recogieron las bacterias a partir de las hojas infectadas utilizando un sacabocados de 10 mm de diámetro. Se cortaron cinco discos ($3,9 \text{ cm}^2$) por cada hoja y se maceraron por percusión mecánica (Agitador RW16 Basic, IKA®) en 1 ml de MgCl_2 10 mM. Finalmente se sembraron diluciones seriadas de cada muestra en placas de LB conteniendo rifampicina. Se prepararon homogeneizados de al menos 4 muestras distintas obtenidas a partir de dos hojas procedentes de dos plantas por cada tratamiento.

4. Técnicas analíticas.

4.1. Detección de 2-TDC volátil en *S. meliloti* mediante microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas (SPME-GC/MS).

Para evaluar la producción de 2-TDC en células crecidas en medio sólido se empleó la metodología SPME-GC/MS (Zhang & Pawliszyn 1993), procediendo de la siguiente manera:

1. Se prepararon viales de vidrio de 10 ml estériles con 3 ml de MM_{AN} (1% agar)
2. Sobre la superficie del medio se inocularon 10 μ l de una suspensión celular de *S. meliloti* (10^8 UFC), preparada y concentrada tal y como se explica en los ensayos de motilidad en superficie (apartado 1.7). Como control, se aplicaron 10 μ l de MM líquido.
3. Los viales se cerraron con un tapón que contenía un septo de silicona y se incubaron durante dos días a 30 °C.

4. La 2-TDC presente en la fase gaseosa entre el tapón y el cultivo bacteriano se recogió introduciendo en el vial una fibra StableFlex SPME de 50/30 μm recubierta con Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco 57298-U). La fibra se mantuvo dentro del vial durante 1 hora a 30 °C. Previamente, dicha fibra había sido acondicionada durante 1 hora a 250 °C en una corriente de helio.
5. Una vez recogida la muestra, la fibra se insertó en el inyector de un aparato de GC/MS (Varian 456GC 240MS, Trampa Iónica) y la desorción se produjo a 280 °C durante 6 min.
6. Tras la desorción, la mezcla de volátiles se separó en una columna DB5MS-UI (30 m, 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 μm). El protocolo establecido para la temperatura del horno fue: 40 °C (3 min.), 140 °C (incrementos de 15 °C/min.) y finalmente 300 °C (incrementos de 15 °C/min) que se mantuvieron 5 min. Se empleó helio como gas portador, a una velocidad de flujo de 1,2 ml/min.
7. Para la detección de las muestras en el espectrómetro de masas se utilizó ionización en modo positivo a 70 eV y 220 °C con un rango de análisis de 40 a 600 m/z.
8. Los espectros de masas de los picos detectados se compararon con los recogidos en la base de datos NIST.
9. La producción de 2-TDC se confirmó y cuantificó posteriormente comparando los espectros obtenidos con el de un estándar puro de la MK (7 – 100 ng), que se preparó y analizó de la misma en que se hicieron las muestras biológicas.

4.2. Detección de AHL en cultivos líquidos de *S. meliloti*.

Para analizar la influencia de la 2-TDC en los niveles de AHL en *S. meliloti* empleamos dos metodologías basadas en el uso de cepas indicadoras.

Por un lado se empleó la cepa indicadora de *S. meliloti* Smalls, desarrollada en el laboratorio de la Dra. Becker (Marburg, Alemania). Esta cepa alberga una mutación en el gen *sinI* lo que la hace incapaz de sintetizar sus propias acil-homoserina lactonas, pero con la que se puede detectar su presencia en el medio gracias a que: (i) posee un *expR* funcional y (ii) tiene fusionados los promotores de *wgeA*, *sinI* y *smb20911* a los genes reporteros fluorescentes *cerulean*, *mCherry* y *mVenus*, respectivamente. Los dos primeros se activan, aumentando así la fluorescencia, en presencia de AHL; el tercero en cambio se reprime fuertemente. Así, midiendo los niveles de fluorescencia

de las tres fusiones reporteras se puede comparar el contenido en AHL de una muestra con un determinado control.

Por otro lado se empleó la cepa indicadora de *A. tumefaciens* NTL4+ (pZLR4), desarrollada por Shaw y colaboradores (1997) y modificada posteriormente por Krol y Becker (2014). Esta cepa contiene la fusión reportera *traG::lacZ*, que se activa en presencia de AHL, y expresa el transportador FadL de *S. meliloti* que mejorar la detección de AHL de cadena larga. Por lo tanto, en este caso el método de detección es a través de la actividad β -galactosidasa.

4.2.1. Detección de AHL con la cepa indicadora de *S. meliloti*

En primer lugar se obtuvieron las muestras de AHL de la siguiente manera:

1. A diferentes tiempos de incubación, se recogieron 100 μ l de cultivos líquidos de las cepas de estudio de *S. meliloti* crecidas en MM con distintas concentraciones de 2-TDC o etanol como control.
2. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm para separar las células del sobrenadante.
3. Se inocularon 2,5 μ l de cada sobrenadante en 500 μ l de una suspensión celular de la cepa indicadora Smas en medio MOPS (suplementado con Tc) a una D.O. 600 nm = 0,1 - 0,15.
4. Se inocularon triplicados de 100 μ l de cada muestra en placas de 96 pocillos (Greiner Bio-One, Carolina del Norte, EEUU) y las placas se incubaron a 30 °C en agitación durante 24 horas.
5. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la fluorescencia de la cepa reportera en un lector de placas TECAN Infinite M200 (Tecan Trading AG, Suiza) con los parámetros adecuados para cada fluoróforo: Cerulean (excitación, 447 nm; emisión, 483 nm), mCherry (excitación, 585 nm; emisión, 619 nm) and mVenus (excitación, 515 nm; emisión, 548 nm). Las medidas de fluorescencia se normalizaron con respecto a la D.O.

4.2.2. Detección de AHL con la cepa indicadora de *A. tumefaciens*

En primer lugar se obtuvieron las muestras de AHL de la siguiente manera:

1. A diferentes tiempos de incubación, se recogieron 100 μ l de cultivos líquidos de las cepas de estudio de *S. meliloti* crecidas en MM con distintas concentraciones de 2-TDC o etanol como control.

2. Las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 13.000 rpm para separar las células del sobrenadante.
3. Todas las muestras, tanto *pellets* como sobrenadantes, se mantuvieron congeladas a -20 °C hasta que finalizó el proceso de recolección, para ser analizadas todas al mismo tiempo.

Para llevar a cabo el bioensayo la cepa indicadora se creció 20-24 horas a 30 °C en LB con los correspondientes antibióticos. Posteriormente se diluyó en medio MGM (dilución 1:200) y se volvió a incubar durante 12-13 horas más, hasta alcanzar una D.O. 600 nm de 0,05-0,1.

El cultivo líquido se mezcló en proporción 1:1 con medio MGM suplementado con 1,5% de agar y a la mezcla se adicionó X-gal (80 µg/ml). Se prepararon placas cuadradas conteniendo 70 ml de esta mezcla, en las que se insertaron unos peines para hacer pocillos en el agar. Las placas se dejaron secar durante media hora.

Finalmente se retiraron los peines y en cada pocillo se cargaron 18 µl de las muestras de las AHL, las cuales se habían preparado durante el secado de las placas de la siguiente manera:

1. Las muestras de sobrenadante se dejaron descongelar a temperatura ambiente, se mezclaron suavemente para homogeneizar y se cargaron en los pocillos.
2. Para extraer las AHL de las muestras celulares, los *pellets* se resuspendieron después de descongelar en 100 µl de una mezcla de MM:etanol 70:30 y se dejaron incubando a temperatura ambiente cuatro minutos.
3. Finalizada la incubación se cargaron en los pocillos del MGM-agar.

Las placas con la cepa indicadora en contacto con las muestras se incubaron una noche a 30 °C, y al día siguiente se visualizaron y midieron los halos de detección, de color azul.

4.3. Determinación de la actividad β -galactosidasa en cultivos celulares.

La determinación de la actividad β -galactosidasa se llevó a cabo en células permeabilizadas según el método descrito por Miller (1972). Este método se basa en una reacción colorimétrica en la que el o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), sustrato incoloro de la enzima β -galactosidasa, al ser hidrolizado por ésta, produce

galactosa y o-nitrofenol. Este último compuesto es de color amarillo y su intensidad puede medirse por espectrofotometría.

La actividad β -galactosidasa fue determinada en cepas que contenían fusiones de la región génica de interés con el gen informador *lacZ*, siguiendo la metodología descrita por Sambrook *et al.* 1989.

Las cepas de estudio se cultivaron en medio rico (TY) con los antibióticos correspondientes, hasta alcanzar la fase exponencial tardía (D.O. 600 nm = 0,9 – 1). Estos preinóculos fueron lavados dos veces con MM líquido (el medio básico de ensayo) como paso previo a la inoculación con el tratamiento final:

- Para los experimentos con GR4 y GRS577 para evaluar expresión de genes de desnitrificación, se preparó una dilución 1:100 de los cultivos lavados en 3 ml de MM o MM suplementado con 10 mM de KNO₃ (añadiendo Tc para evitar la pérdida del plásmido con la fusión). Estos cultivos se incubaron a 30 °C y en agitación hasta alcanzar una D.O. 600 nm = 0,4 – 0,6. Se tomaron muestras de 100 μ l para determinar la actividad β -galactosidasa en condiciones de aerobiosis. El resto del cultivo fue sometido a microaerobiosis, gaseando los tubos con una corriente de oxígeno/argón 2%/98% e incubando durante 6 horas a 30 °C. Transcurrido este tiempo, se volvieron a coger alícuotas de 100 μ l para medir la actividad β -galactosidasa en microaerobiosis. Antes de coger las muestras para medir la actividad enzimática se midió la absorbancia del cultivo a 600 nm.
- Para los experimentos con el transposante GTR3033 portando la fusión P20347::*lacZ*, cuya expresión se activa en el mutante en respuesta a MK y otros compuestos alifáticos, se hizo la misma dilución del cultivo lavado en 3 ml de MM líquido suplementado con Tc y el tratamiento correspondiente (MK, AHL, etc). Los tubos se incubaron 24 horas a 30 °C en agitación (se alcanzó una D.O. 600 nm = 0,4 – 0,5). Finalmente se procedió a medir la absorbancia exacta del cultivo y posterior mente la actividad β -galactosidasa.

Para medir la actividad β -galactosidasa de las muestras de 100 μ l recogidas se procedió de la siguiente manera:

1. Se lisaron las células con una mezcla de 900 μ l de tampón Z, 20 μ l de cloroformo y 5 μ l de 0,1% SDS.
2. La mezcla se agitó diez segundos con vórtex y se incubó 10 minutos a 30 °C.

3. La actividad β -galactosidasa comenzó tras añadir 200 μ l de una solución 4 mg/ml del sustrato ONPG en tampón Z.
4. La incubación de los extractos enzimáticos con el sustrato se hizo a 30 °C prolongándose hasta la aparición de una coloración amarilla suficientemente intensa y estable.
5. La reacción se detuvo por la adición de 500 μ l de una solución 1 M de Na_2CO_3 .
6. Se anotó el tiempo transcurrido desde la adición de ONPG y se separaron los restos celulares por centrifugación durante 3 minutos a 12.000 rpm.
7. El sobrenadante se recogió en un tubo y se determinó la absorbancia a 420 nm, utilizando como blanco 100 μ l de MM con todos los componentes de la reacción.

La actividad β -galactosidasa se expresó en Unidades Miller calculadas mediante la siguiente fórmula:

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

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

Tampón Z

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:	0,06 M
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$:	0,04 M
KCl:	0,01 M
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:	0.001 M
β -mercaptoetanol:	0.05 M

4.4. Detección y determinación de bioluminiscencia.

Para los análisis cualitativos se empleó un sistema detector de luz compuesto por una cámara CCD modelo C5405-51, un amplificador modelo C2741-3OH y una unidad intensificadora de la imagen modelo M4314 (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japón). Con este sistema se podían visualizar y fotografiar colonias bacterianas luminiscentes crecidas en placa.

Para los análisis cuantitativos se empleó el lector de placas multipocillo TECAN Infinite M200.

4.5. Ensayos de colapso de gota.

Siguiendo el protocolo descrito por Jain y colaboradores (1991), se comparó la actividad surfactante de la 2-TDC a distintas concentraciones con agua como control negativo y SDS al 10% como control positivo. Así, se emplearon disoluciones de la metilcetona a 5, 10 y 50 mM, lo que equivale en porcentaje peso/volumen a 0,1, 0,2 y 1%, respectivamente. En este caso, para evitar la rápida volatilización de las muestras la disolución se hizo en agua destilada, partiendo de soluciones stock preparadas en etanol a 50, 100 y 500 mM. La misma dilución se hizo con etanol absoluto como control del solvente. Para observar la forma de las gotas se aplicaron 2 μ l de cada muestra sobre una tira de parafina plástica.

5. Técnicas de microscopía.

Además del microscopio láser confocal empleado en los análisis de formación de biopelículas (apartado 1.9.1 de Materiales y Métodos), se llevaron a cabo visualizaciones al microscopio electrónico de transmisión. Para ellos, se realizó el ensayo *swarming* como se especifica en la sección 1.7 de esta sección. A las 24 horas de incubación se procedió a la colocación de 25 μ l de agua bi-destilada en el borde de la colonia y se colocó la rejilla encima de la gota durante cinco minutos. Posteriormente se volvió a colocar la rejilla en otra gota de agua durante un minuto. Este paso se repitió una segunda vez. Posteriormente fue colocada encima de una gota de acetato de uranilo al 2% durante tres minutos y se dejó secar una hora, al término de ésta, se procedió a la visualización de las muestras en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011. Las imágenes se obtuvieron con una cámara CCD Orius Gatan.

CAPÍTULO 1

**Efecto de la 2-Tridecanona en los
modos de vida libre y simbiótico de
*Sinorhizobium meliloti***

1. Efecto de la 2-Tridecanona en los modos de vida libre y simbiótico de *S. meliloti*.

1.1. Importancia de las características estructurales en la promoción de la movilidad en superficie ejercida por la 2-Tridecanona.

Como se ha indicado en la introducción, la primera vez que se describió la movilidad *swarming* en un rizobio fue en la cepa QS77, un mutante derivado de *S. meliloti* GR4 y afectado en el gen *fadD*. La mutación en *fadD* induce movilidad en superficie en diversas cepas silvestres de *S. meliloti*, así como también en mutantes aflagelados, y afecta negativamente a la formación de biopelículas en esta bacteria. (Amaya-Gómez *et al.* 2015; Bernabéu-Roda *et al.* 2015; Soto *et al.* 2002).

La caracterización de la cepa QS77 ha permitido la identificación de la 2-TDC como un compuesto de naturaleza volátil que estimula la movilidad en superficie en diversas cepas de *S. meliloti*. Los estudios llevados a cabo previamente en nuestro grupo de investigación para intentar descifrar el mecanismo de acción de esta molécula determinaron que, sin afectar al crecimiento bacteriano, la 2-TDC: i) estimula de forma específica el desplazamiento en superficie sin alterar la movilidad tipo *swimming*, a través de mecanismos dependientes e independientes de acción flagelar; ii) muestra actividad en un rango de concentraciones (0,5 – 2 μmol) en donde el desplazamiento bacteriano es máximo; y iii) ejerce dicho efecto inductor de forma más pronunciada cuando se aplica como volátil (Bernabéu-Roda 2014).

Para conocer si el efecto inductor del desplazamiento en superficie es específico de la 2-TDC o es algo inherente a otras cetonas alifáticas, se realizaron ensayos de motilidad en medio mínimo con agar Noble (MM_{AN}) al 1% con la cepa GR4, evaluando la actividad de nueve de estos compuestos, que diferían de la 2-TDC o bien en la longitud de la cadena alifática o bien en la posición del grupo carbonilo. En estos ensayos todas las cetonas se aplicaron como volátiles, inoculando en la tapa de la placa Petri 20 μl de soluciones madre de cada una de ellas, preparadas en etanol absoluto a varias concentraciones, que se eligieron en función del espectro de acción que presenta la 2-TDC en las condiciones testadas. Así, se tomó 50 mM como concentración de referencia, ya que está dentro del rango óptimo de estimulación de la motilidad en MM_{AN} (1% agar) (Bernabéu-Roda 2014), 10 mM (cinco veces por debajo) y 250 mM (cinco veces por encima). Esto suponía la adición de 1, 0,2 y 5 μmol de cada cetona, respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.1.

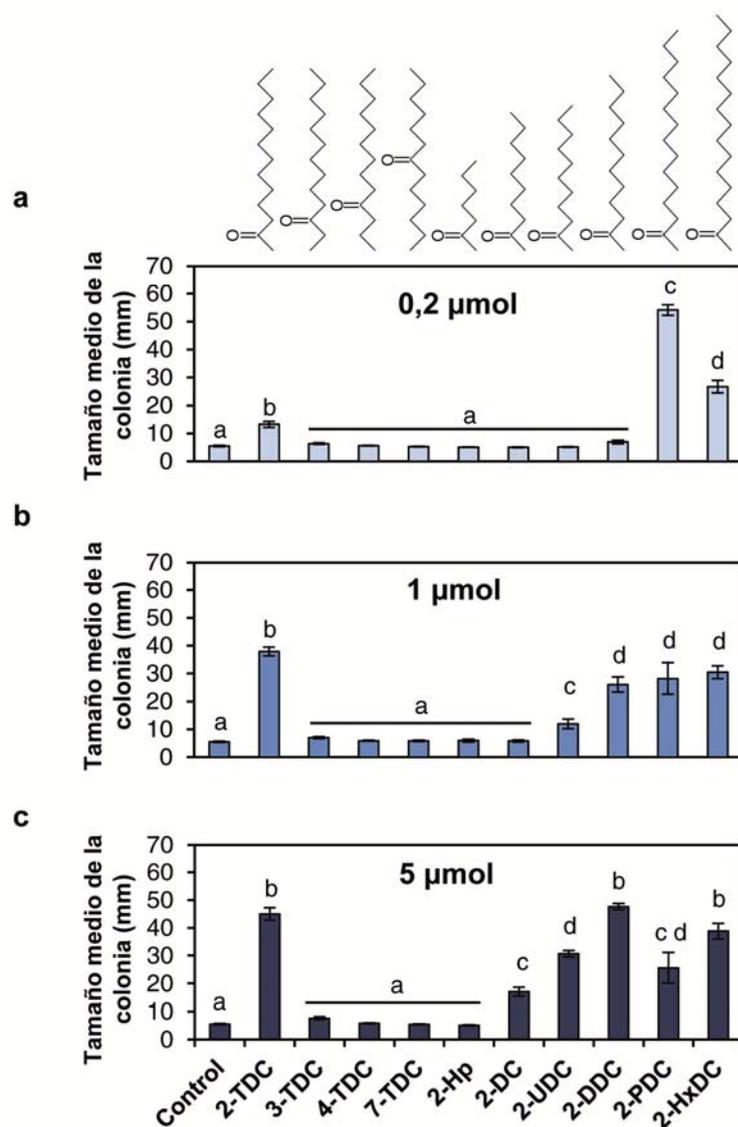


Figura 1.1: Efecto de la estructura y la concentración de distintas cetonas sobre la movilidad en superficie de *S. meliloti*. Los gráficos muestran la migración en superficie de *S. meliloti* GR4 en MM_{AN} (1% agar) tras 48 horas de incubación con 0,2 (a), 1 (b) y 5 (c) μmol de distintas cetonas alifáticas. Los tratamientos se aplicaron inoculando en la tapa de la placa Petri 20 μl de etanol (control) o de las metilcetonas preparadas a 10, 50 y 250 mM, respectivamente. La estructura de cada una de ellas se muestra en la parte superior de la figura. Las barras de error representan el error estándar de la media, calculada a partir de al menos tres experimentos independientes con tres réplicas. Las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$) se indican con distintas letras.

Como ya se había observado previamente, la aplicación de 0,2 μmol de 2-TDC, si bien estimulaba de forma significativa la motilidad con respecto al control, daba lugar a un menor desplazamiento en comparación a 1 y 5 μmol . A pesar de tener la misma longitud de cadena, las cetonas 3-, 4-, y 7-Tridecanona (3-TDC, 4-TDC y 7-TDC) no indujeron la motilidad en superficie en ninguna de las concentraciones ensayadas. Estos resultados indican que la posición del grupo carbonilo es clave en la actividad

biológica de la 2-TDC. Por otro lado, la longitud de cadena de la MK también parece ser un atributo estructural que influye en la actividad de la molécula. Así, la MK de cadena más corta, 2-Heptanona (2-Hp, C7), fue incapaz de inducir motilidad en ninguna de las concentraciones utilizadas. El resto de MK ensayadas indujeron cierto grado de desplazamiento en superficie, observándose en líneas generales menor actividad en MK de cadena más corta y cuanto menor era la concentración aplicada. Así, la 2-Decanona (2-DC, C10), la 2-Undecanona (2-UDC, C11) y la 2-Dodecanona (2-DDC, C12), no mostraron actividad cuando se aplicaron en la concentración más baja pero fueron aumentando progresivamente su efecto estimulador a medida que aumentaba la cantidad de compuesto aplicado, si bien únicamente con 5 μmol de 2-DDC se consiguió promover la motilidad de forma similar a la 2-TDC. Excepciones a este comportamiento general lo encontramos en las MK 2-Hexadecanona (2-HxDC, C16), que indujo una actividad similar en las tres concentraciones ensayadas, y especialmente en la 2-Pentadecanona (2-PDC, C15), cuya actividad a la concentración más baja (0.2 μmol) fue superior incluso que la mostrada por 1 μmol de 2-TDC. De hecho, usando concentraciones de 2-PDC inferiores (40 nmol and 20 nmol) en las que 2-TDC no muestra actividad alguna, aún se siguió observando promoción de la movilidad en superficie de GR4 (24.9 ± 3 and 8.8 ± 0.6 mm, respectivamente).

Los resultados de estos experimentos apoyan lo que ya se vio con la 2-TDC, que estos compuestos son más o menos activos dentro de un determinado rango de concentración, y apunta a la existencia de un mecanismo de reconocimiento específico en el que podría participar un receptor que desencadene posteriormente una respuesta. Para investigar más en profundidad sobre esta idea llevamos a cabo ensayos de competencia, en donde evaluamos el efecto sobre la motilidad de *S. meliloti* GR4 de mezclas de 2-TDC y otras cetonas que hubiesen presentado escasa o nula actividad inductora. Se hizo una primera evaluación con mezclas en proporción 1:1 de 2-TDC y 7-TDC, 2-Hp o 2-DC, colocando en la tapa de la placa Petri 1 μmol de cada mezcla. De las tres sólo la 7-TDC anuló completamente el efecto promotor de la 2-TDC sobre la movilidad en superficie (Figura 1.2a). Para saber cuál era la concentración mínima de 7-TDC necesaria para suprimir el efecto inductor de la motilidad de la 2-TDC, probamos con mezclas que contenían 0,5 μmol de dicha cetona y cantidades crecientes de 7-TDC (desde 500 pmol hasta 5 μmol). De esta forma pudimos comprobar que a medida que aumenta la proporción de 7-TDC en la mezcla se va reduciendo paulatinamente la movilidad, y que ésta se anula del todo a partir de que ambas cetonas estén en la misma proporción (Figura 1.2b).

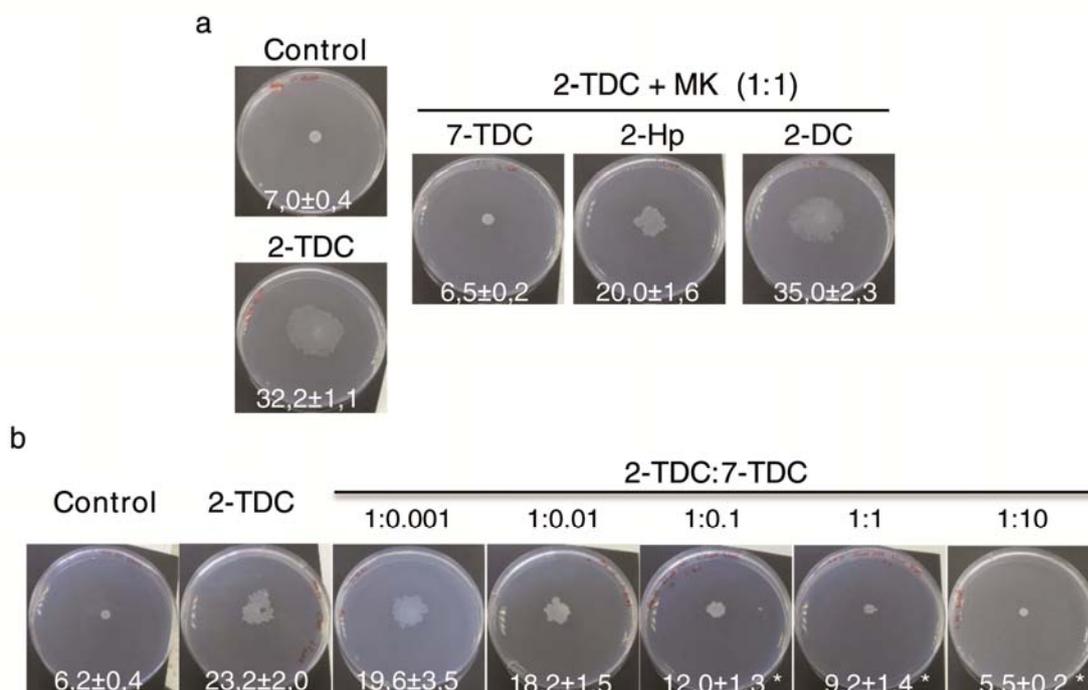


Figura 1.2: Competencia entre 2-TDC y otras cetonas. Motilidad en superficie de *S. melliloti* GR4 en MM_{AN} (1% agar) tras 48 horas de incubación con mezclas de 2-TDC y otras cetonas alifáticas aplicadas como volátiles. Como controles negativo y positivo se utilizaron etanol (20 μ l) y 1 μ mol de 2-TDC, respectivamente. En todos los casos se adicionó a la tapa de la placa Petri 20 μ l del tratamiento. En cada imagen se muestra la media del halo de expansión (en mm) con su correspondiente error estándar. **(a)** Se prepararon mezclas conteniendo 0,5 μ mol de 2-TDC y 0,5 μ mol de 7-TDC, 2-Hp o 2-DC. **(b)** Para medir el efecto de la concentración de 7-TDC las mezclas se prepararon con 0,5 μ mol de 2-TDC y con cantidades crecientes de 7-TDC en incrementos de 10, desde 500 pmol hasta 5 μ mol. Los valores señalados con asterisco difieren significativamente de la motilidad alcanzada con el control positivo de 2-TDC de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$).

Con todo, podemos concluir que existe una cierta especificidad de acción en cuanto a promover en mayor o menor grado la movilidad en superficie, que viene determinada por la estructura de la molécula. En ese sentido, tanto la posición del grupo carbonilo como la longitud de cadena de la cetona juegan un papel importante, siendo la presencia del grupo cetónico en segunda posición un factor más determinante. Por tanto, los rasgos estructurales de la 2-TDC determinan la actividad biológica de ésta, lo que sugiere que en el mecanismo de acción existe un reconocimiento específico.

1.2. Efecto de la 2-Tridecanona en la morfología y las propiedades de la envuelta celular en *S. meliloti* GR4.

Se sabe que diversas bacterias que se desplazan en superficie mediante movilidad *swarming* sufren un proceso de diferenciación celular que conlleva elongación e hiperflagelación (Partridge & Harshey 2013b). Para comprobar si la 2-TDC es capaz de inducir cambios a nivel morfológico se realizaron observaciones mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) de células crecidas en MM_{AN} (1% agar) en presencia de 2-TDC volátil.

No se observaron cambios significativos en la forma y el tamaño de las células crecidas en presencia de 2-TDC en comparación al control con etanol (Figura 1.3). Tampoco se apreciaron diferencias obvias en el número de flagelos. Estos resultados indican que la 2-TDC no tiene efectos a nivel de morfología celular ni tampoco estimula la producción de más flagelos.

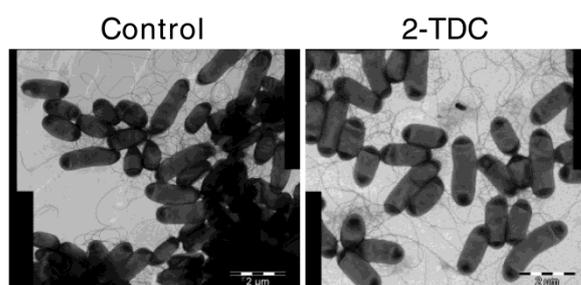


Figura 1.3: La 2-TDC no afecta a la morfología ni a la producción de flagelos en *S. meliloti* GR4. Las imágenes obtenidas al TEM muestran células crecidas en medio semisólido (MM_{AN} 1% agar) en presencia de 1 µmol de 2-TDC (o una cantidad equivalente de etanol como control) tras una incubación de 20-24 horas.

Como se ha explicado en la introducción, para que las bacterias puedan desplazarse en superficie mediante movilidad *swarming* deben emplear estrategias que les permitan extraer agua del medio, vencer fuerzas de fricción y reducir la tensión superficial del fluido que rodea las células, facilitando la humectación del territorio aún no colonizado y que queda justo por delante del avance de la colonia (Partridge & Harshey 2013a).

La elongación y la lubricación de la envuelta celular mediante la producción de polímeros que, o bien son directamente liberados al medio o permanecen asociados a la dicha envuelta, se han descrito como estrategias empleadas para reducir las fuerzas de fricción entre la colonia bacteriana y la superficie. Dado que la 2-TDC no induce elongación celular, nos preguntamos si podría alterar las propiedades fisicoquímicas de la envuelta. Se analizó la hidrofobicidad de células crecidas en presencia de 2-TDC siguiendo el método de adhesión a hidrocarburos (MATH, por sus siglas en inglés)

(Coutinho *et al.* 2011; Rosenberg *et al.* 1980). Se analizaron tanto células crecidas en MM líquido en fase de crecimiento exponencial media y tardía como células crecidas en MM_{AN} semisólido. Tampoco esta vez se observaron diferencias entre 2-TDC y el control en ninguna de las condiciones testadas (datos no mostrados).

Por último planteamos la posibilidad de que la 2-TDC pudiera facilitar el desplazamiento bacteriano en superficie disminuyendo la tensión superficial como lo hacen surfactantes, emulsificantes, o detergentes, compuestos de propiedades anfipáticas. La solubilidad de la 2-TDC en agua ($5,03 \times 10^4$ mol/l) es ya un indicativo de que este compuesto no puede actuar como surfactante, humectante o emulsificante (Kotowska & Isidorov 2011). Ensayos de colapso de gota confirmaron la ausencia de actividad surfactante de la 2-TDC (datos no mostrados). Teniendo en cuenta esto no parece que la mayor motilidad experimentada por *S. meliloti* en presencia de 2-TDC sea debida al efecto de ésta como biosurfactante.

Los resultados obtenidos en estos experimentos muestran que la promoción del desplazamiento en superficie de *S. meliloti* GR4 provocada por la 2-TDC no tiene su principal causa en el origen de cambios a nivel estructural o de propiedades físico-químicas de la envuelta celular.

1.3. La 2-Tridecanona afecta negativamente a la formación de biopelículas de *S. meliloti*.

Dado que en *S. meliloti*, al igual que ocurre en otras bacterias, la movilidad en superficie y la formación de biopelículas son fenómenos que se encuentran regulados de manera coordinada (Amaya-Gómez *et al.* 2015), decidimos analizar la influencia de la 2-TDC en la capacidad de formar comunidades bacterianas adheridas a superficie utilizando las cepas GR4 y Rm1021 de *S. meliloti*. Para ello se emplearon variantes de dichas cepas que portan el plásmido pHc60, en el cual se expresa de forma constitutiva el gen de la proteína verde fluorescente *gfp* (Cheng & Walker 1998), y mediante microscopía láser confocal se analizaron las biopelículas formadas por las mismas sobre superficie de vidrio en condiciones de cultivo en estático. Las observaciones se hicieron tras tres días de incubación, ya que es el tiempo mínimo necesario para que se forme un biofilm estable en *S. meliloti* (Amaya-Gómez *et al.* 2015).

Mientras que en ausencia de 2-TDC ambas cepas formaban biopelículas que cubrían la mayor parte de la superficie del portaobjetos de vidrio, la presencia de este

compuesto a una concentración de 50 μM reducía significativamente el área colonizada (Figura 1.4). Además, la aplicación de 2-TDC redujo significativamente la biomasa presente en el biofilm, determinada como niveles totales de fluorescencia emitida. Así, la biomasa adherida al vidrio de Rm1021-*gfp* se redujo una media de un 55%, mientras que la de GR4-*gfp* experimentó una bajada de casi el 40% con respecto a la situación control (Figura 1.4b). Aunque no se muestra aquí, hemos podido comprobar que la aplicación de la MK a concentraciones más altas reduce aún más la masa celular del biofilm, indicando que, al igual que ocurre con la movilidad, hay un efecto dependiente de dosis.

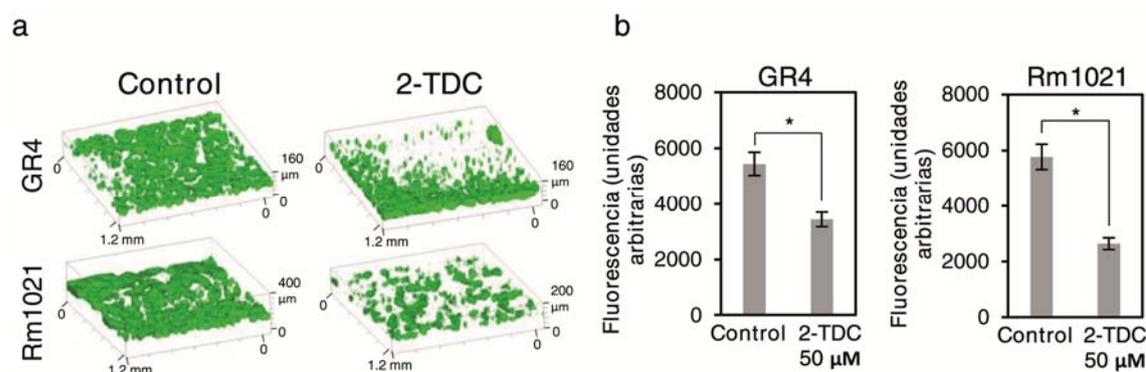


Figura 1.4: La 2-TDC influye negativamente en el establecimiento de biopelículas en *S. meliloti*. (a) Proyecciones tridimensionales reconstruidas a partir de imágenes obtenidas al microscopio confocal de las biopelículas formadas por GR4-*gfp* y Rm1021-*gfp* sobre superficie de vidrio. Las cepas crecieron durante 3 días en MM líquido conteniendo 2-TDC a una concentración final de 50 μM o etanol al 0,1% como control. La superficie analizada es de 1,28x1,28 mm². (b) Cuantificación del nivel de fluorescencia emitido por cada muestra mediante análisis de imagen con ImageJ. Se midieron los niveles de intensidad de gris y se calculó la media y el error estándar en al menos dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas tras un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$).

Por lo tanto, la 2-TDC además de promover la motilidad en superficie reduce la capacidad de establecer biopelículas en *S. meliloti*.

1.4. Evaluación del efecto de la 2-Tridecanona en la regulación del *quorum sensing* en *S. meliloti*.

Como ya se ha indicado en la introducción, la regulación coordinada de movilidad y formación de biopelículas es clave para aquellas bacterias, ya sean patógenas o simbióticas, que infectan hospedadores eucariotas, y uno de los principales mecanismos de regulación que controla ambos procesos es el *quorum sensing* (QS)

(Papenfort & Bassler 2016; Danhorn & Fuqua 2007). El sistema QS Sin/ExpR de *S. meliloti* está constituido por las proteínas SinI-SinR-ExpR, y por diversas acil-homoserina lactonas como moléculas señal. Este sistema controla de forma inversa la expresión de genes de motilidad y producción de exopolisacáridos (succinoglucano y galactoglucano), que a su vez son importantes para el establecimiento de biopelículas (Fujishige *et al.* 2006; Gao *et al.* 2005; Hoang *et al.* 2004). Teniendo en cuenta los fenotipos que la 2-TDC altera en *S. meliloti*, decidimos analizar el posible efecto de esta MK sobre la regulación QS en dicha bacteria.

En primer lugar, evaluamos el efecto de la 2-TDC en la expresión de genes QS mediante el empleo de fusiones traduccionales de los genes *sinI* y *wgeA* al gen reportero *egfp*, que codifica una variante de la proteína verde fluorescente. Como ya se indicó, el gen *sinI* codifica la sintasa de AHL, y el gen *wgeA*, cuya expresión es dependiente de la proteína reguladora ExpR, participa en la biosíntesis del exopolisacárido galactoglucano o EPS II (Marketon *et al.* 2002; Pellock *et al.* 2002). La actividad de ambos promotores en presencia/ausencia de 2-TDC se analizó en las cepas GR4 y GR4A portando los plásmidos pLK64 (*psinI::egfp*) y pLK115 (*pwgeA::egfp*) (Charoenpanich *et al.* 2013; McIntosh *et al.* 2008). Aunque ambas cepas pueden sintetizar AHL, sólo GR4A posee un sistema QS completo, ya que esta cepa, al contrario que GR4, tiene un gen *expR* funcional.

En primera instancia se analizó el efecto de distintas concentraciones de 2-TDC en células crecidas en MM líquido. Las concentraciones que se probaron fueron 10, 50 y 100 μM , que se aplicaron al medio en el momento de inocular la bacteria; para el control se utilizó etanol al 0,1%. A distintos tiempos (24, 34 y 48 horas) se tomaron alícuotas de 100 μl de cada una de las muestras y se midió la fluorescencia. Tanto en GR4 como en GR4A la expresión de los genes *sinI* y *wgeA* no varió significativamente entre ninguna de las concentraciones de 2-TDC analizadas y el tratamiento control (datos no mostrados). Además del comportamiento en medio líquido, analizamos el efecto en expresión génica en células crecidas en medio mínimo semisólido (MM_{AN} 0,6% agar), siguiendo el mismo procedimiento experimental que se emplea en los ensayos de movilidad en superficie (ver Materiales y Métodos) y aplicando 0,2, 1 y 10 μmol de la metilcetona como compuesto volátil. Tampoco en estas condiciones se observaron diferencias en expresión con respecto al control, en ninguna de las dos cepas ensayadas y con ninguna de las concentraciones probadas (datos no mostrados). Estos resultados indican que la 2-TDC no altera los niveles de expresión de genes que participan en regulación QS en *S. meliloti*.

Aunque a nivel de expresión de *sinI* la 2-TDC no parece ejercer efecto, nos propusimos analizar si la MK influye de alguna manera en el contenido de AHL. Para ello empleamos la cepa reportera Smais (del inglés *Sinorhizobium meliloti* *AHLs indicator strain*) desarrollada en el grupo de la Dra. Anke Becker (McIntosh, en preparación). Esta cepa, derivada de la cepa Rm2011, posee tres características principales: es un mutante *sinI* incapaz de producir AHL, posee un gen *expR* funcional y contiene una construcción plasmídica en la que las regiones promotoras de los genes *wgeA*, *sinI* y *smb20911* están fusionadas a los genes reporteros fluorescentes *cerulean*, *mCherry* y *mVenus*, respectivamente. La actividad de estos promotores está controlada por el complejo ExpR-AHL y regulada en función de la cantidad de moléculas señal en la muestra; en general en presencia de AHL los genes *sinI* y *wgeA* están regulados positivamente (aunque en el caso de *sinI* hay una regulación negativa cuando se supera una determinada concentración), mientras que el gen *smb20911* (que codifica un pequeño péptido de función desconocida) se encuentra altamente reprimido. Observando los perfiles de expresión de las tres fusiones reporteras se puede determinar si el contenido en AHL en una muestra es mayor o menor en comparación a un determinado control.

En primer lugar evaluamos si la 2-TDC *per se* afectaba la expresión de algunas de las fusiones traduccionales de la cepa Smais en respuesta a distintas concentraciones de una AHL sintética, la 3-oxo-C_{16:1}-HL (3O-C16:1-HL). Se midió la fluorescencia de los genes reporteros en condiciones de crecimiento en medio mínimo líquido a lo largo del tiempo, adicionando la 2-TDC al medio desde el inicio de la incubación. En la Figura 1.5 se muestran de forma representativa los resultados obtenidos cuando se aplicó 50 µM 2-TDC; las mismas medidas se hicieron para 10 y 500 µM 2-TDC, y los resultados fueron muy similares (datos no mostrados). En estas condiciones, la aplicación de 2-TDC (50 µM) no causó alteraciones en el crecimiento de la cepa Smais con respecto al control con etanol (Figuras 1.5a y 1.5b). Tampoco se observaron cambios importantes en el patrón de fluorescencia de ninguno de los genes reporteros en ausencia de AHL (Figuras 1.5c y 1.5d, DMSO). Con la adición de 3O-C16:1-HL la expresión de *wgeA* se fue incrementando de forma progresiva con la concentración, mientras que la expresión de *smb20911* cayó drásticamente; por su parte, el gen *sinI* alcanzó su máxima expresión con 50 nM 3O-C16:1-HL, para después decaer a medida que iba aumentando la concentración de AHL (Figura 1.5c). Los perfiles de expresión de *wgeA* y *smb20911* no variaron significativamente tras la adición de 2-TDC. Sólo en el caso de la expresión de *sinI* se pudo observar una ligera disminución en presencia de la MK, más acentuada en los cultivos tratados con 3O-C16:1-HL 1000 nM (Figura 1.5d). Por tanto, aunque la 2-TDC no parece influir directamente sobre la

expresión de la sintasa de AHL sí disminuye, aunque ligeramente, su expresión en respuesta a dichas moléculas señal.

También se ensayó el comportamiento de la cepa Smais en condiciones inductoras de motilidad, es decir, en medio mínimo semisólido aplicando 2-TDC como compuesto volátil. Dado que en los ensayos realizados en MM_{AN} (0,6% agar) con las fusiones *psinI::egfp* y *pwgeA::egfp* no se obtuvieron resultados reseñables, decidimos subir el porcentaje de agar al 1%, donde las diferencias en movilidad con y sin 2-TDC son mayores. Igual que se había observado para otras cepas de *S. meliloti*, la 2-TDC estimulaba la motilidad en superficie de la cepa Smais, consiguiéndose un mayor grado de desplazamiento cuando se aplicó 1 μ mol de la cetona (Figura 1.6a), con lo que optamos por analizar la expresión de los genes reporteros en esas condiciones. La adición de 3O-C16:1-HL confería a la cepa Smais un fenotipo mucoso, que además facilitaba un mayor desplazamiento en superficie en comparación al control con DMSO (Figura 1.6b). La capacidad de esta AHL para estimular la motilidad en superficie de *S. meliloti* ya se había descrito previamente (Gao *et al.* 2012). La aplicación de 1 μ mol de 2-TDC incrementó de manera notable el halo de expansión de Smais (Figura 1.6b). Además de para establecer unas condiciones de partida para los experimentos de expresión génica, estos ensayos de movilidad han servido para poner de manifiesto que las AHL no son esenciales para el desplazamiento en superficie inducido por la 2-TDC, ya que la cepa Smais (*sinI*) responde a la MK.

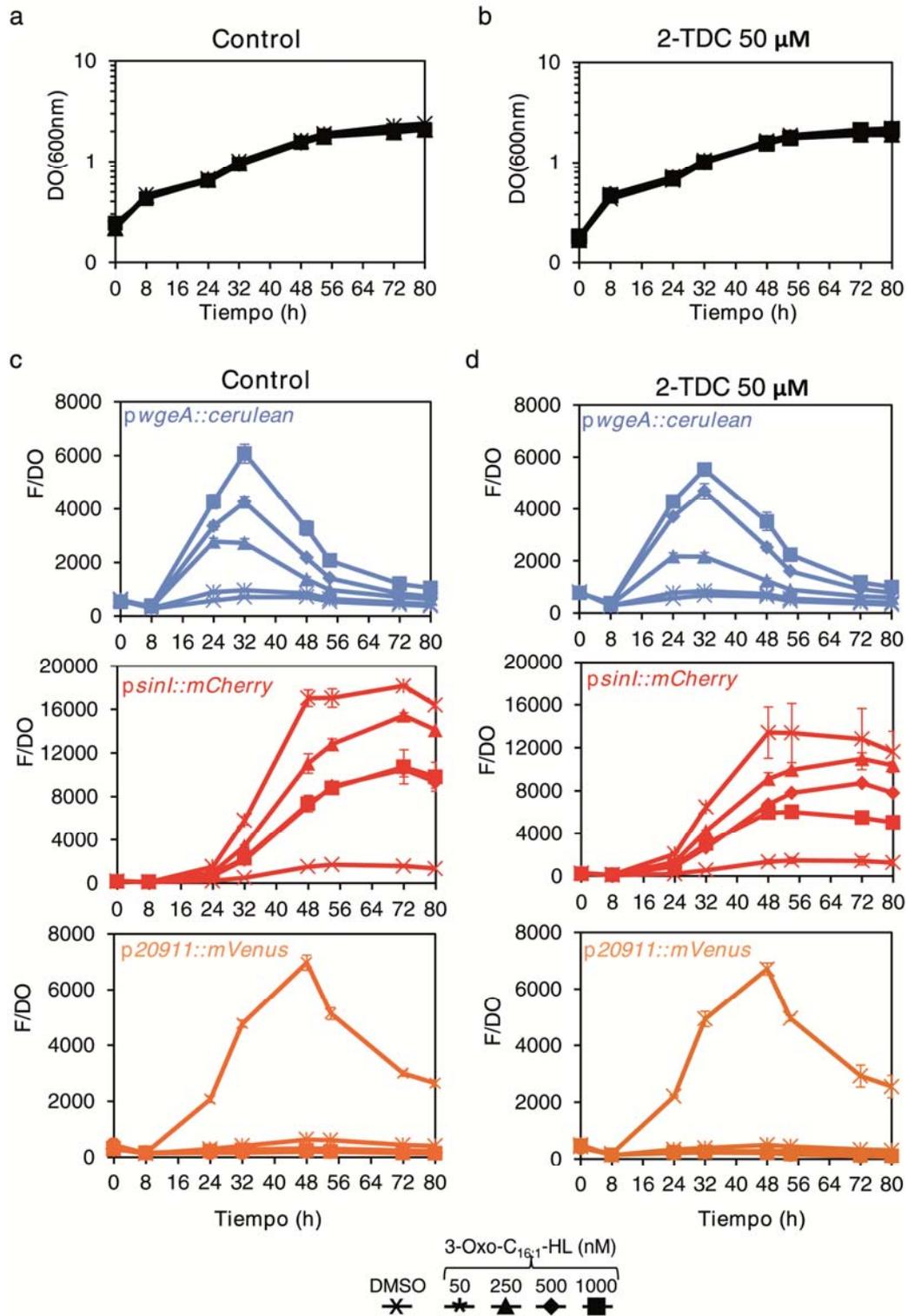


Figura 1.5: Efecto de la 2-TDC en la expresión de genes QS en respuesta a la AHL 3-Oxo-C_{16:1}-HL en medio líquido. La cepa Smais se creció en ausencia (Control, etanol al 0,1%) o presencia de 2-TDC (50 μM) en MM líquido conteniendo distintas concentraciones de la AHL (ver leyenda en la parte inferior). La adición de esta molécula se hizo a partir de soluciones 1000 veces concentradas preparadas en DMSO. Se muestran las curvas de crecimiento de esta cepa en los distintos medios de cultivo bajo la condición control con etanol (**a**) o en presencia de 2-TDC (**b**). El efecto en la expresión de genes QS se analizó comparando la fluorescencia de las fusiones transcripcionales *pwgeA::cerulean*, *psinI::mCherry* y *p20911::mVenus* en ausencia (**c**) o presencia (**d**) de 2-TDC.

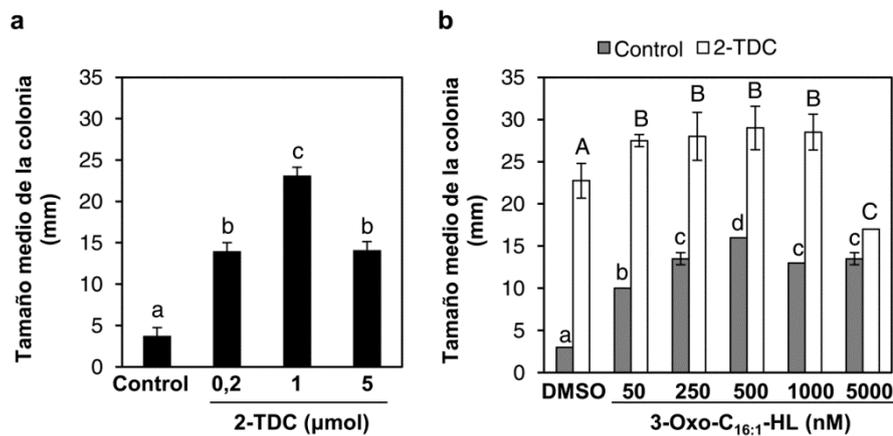


Figura 1.6: Motilidad en superficie de *S. meliloti* Smais en respuesta a 2-TDC y/o AHL. Los ensayos de motilidad se hicieron en MM_{AN} (1% agar) incubando la cepa durante 24 horas a 30 °C con los distintos tratamientos. **(a)** Se muestra el grado de expansión de la cepa Smais en ausencia de AHL exógena y en presencia de 0,2, 1 y 10 μmol de 2-TDC, aplicada como volátil inoculando en la tapa de la placa Petri 20 μl de soluciones preparadas en etanol a 10, 50 y 500 mM. Como control se adicionó una cantidad equivalente de dicho solvente. **(b)** Efecto de la aplicación de 1 μmol de 2-TDC en un medio adicionado con distintas concentraciones de 3-Oxo-C_{16:1}-HL. Los gráficos muestran el diámetro medio de expansión del halo con el error estándar, calculados a partir de al menos ocho medidas en dos experimentos independientes. Las diferencias significativas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$) se indican con distintas letras.

Para hacer las medidas de fluorescencia en estas condiciones de crecimiento en semisólido, se recogieron (siempre que fue posible) y se midieron por separado células situadas en el centro de la colonia y células situadas en el borde. Análisis previos de expresión a partir de células recogidas de toda la colonia completa dieron lugar a resultados poco consistentes y con un alto grado de variabilidad entre distintos experimentos (datos no mostrados). Una causa posible de esta variabilidad podría estar en la heterogeneidad de las muestras, ya que el estado fisiológico de las células que crecen en el centro de una colonia móvil puede variar con respecto a las que se encuentran en el frente de la misma. Por ello se trató de minimizar la variabilidad tomando muestras lo más homogéneas posible.

En ausencia de AHL, no hubo diferencias en expresión de los genes QS entre el tratamiento control y la 2-TDC en células tomadas del centro de la colonia (datos no mostrados). En cambio, células recogidas del borde de la colonia que presentaban un desplazamiento activo, mostraron una expresión significativamente reducida de los genes *sinI* y *smb20911*. Al no haber AHL en el medio, la actividad del promotor de *wgeA* era muy baja y no variaba entre la 2-TDC y el control con etanol (Figuras 1.7a, 1.7b y 1.7c, DMSO). La expresión de dicho gen aumentó cuando se adicionó al medio la homoserina lactona 3O-C16:1-HL, pero en presencia de 2-TDC dicha expresión

estaba disminuida con respecto al control (Figura 1.7a). Algo similar le ocurrió al gen *sinI*: independientemente de la concentración de AHL empleada, la expresión de este gen fue siempre inferior cuando la cepa Smais crecía en presencia de 2-TDC en comparación al control con etanol. Al igual que ocurría en medio líquido, la máxima inducción de *sinI* se consiguió añadiendo 50 nM de 3O-C16:1-HL (Figura 1.7b). Por su parte, la fluorescencia emitida por la fusión *p20911::mVenus* cayó drásticamente en el medio suplementado con AHL, y lo hizo de la misma manera tanto en presencia como en ausencia de 2-TDC (Figura 1.7c). Estos resultados sugieren que las diferencias de expresión observadas en presencia/ausencia de 2-TDC en los genes QS analizados pueden ser debidas simplemente a un efecto indirecto, como consecuencia de que las células que crecen en ausencia de la MK están más confinadas, y por tanto es de esperar que a nivel fisiológico presenten diferencias con respecto a las que se están desplazando inducidas por la 2-TDC. El perfil de expresión que muestran las tres fusiones traduccionales cuando la cepa Smais crece en un medio que restringe totalmente la motilidad apoya esta idea. Ensayos de expresión desde células crecidas en MM suplementado con agar Pronadisa (MM_{AP}) al 1,3% en lugar de agar Noble, muestran que no hay variación en la expresión de *sinI*, *wgeA* o *smb20911* independientemente de que haya o no 2-TDC (Figura 1.8). En estas condiciones de cultivo, el efecto inductor de la 2-TDC se anula completamente.

En resumen, los experimentos llevados a cabo con la cepa Smais indican que no hay un efecto directo de la 2-TDC en la expresión de genes de *quorum sensing*. La expresión del gen *sinI* en esta cepa sólo se ve ligeramente afectada por la presencia de la MK cuando hay AHL en el medio. Esto sugiere una posible conexión entre la 2-TDC y el metabolismo general de AHL a través de mecanismos de regulación postranscripcionales, que no tengan su origen directamente a través del gen de la sintasa pero que repercutan en el mismo. Decidimos por tanto evaluar cómo variaba la cantidad de AHL presentes en sobrenadante de cultivo de *S. meliloti* GR4 y GR4A en función de la concentración de 2-TDC. De nuevo se emplearon estas dos cepas para ver si existían diferencias entre tener o no un gen *expR* funcional. El procedimiento experimental se explica de forma más extendida en la sección de Materiales y Métodos. Brevemente, el experimento consistió en incubar durante 24 horas la cepa reportera Smais con sobrenadante de cultivos de GR4 y GR4A crecidas en MM líquido suplementado con 2-TDC 10, 50 y 500 µM, etanol 0,1% como tratamiento control, o sin tratamiento alguno. Tras la incubación de la cepa reportera se midió la fluorescencia para cada fusión traduccional. Dichos sobrenadantes se recogieron a

distintos tiempos para muestrear el contenido de AHL a lo largo de la curva de crecimiento. En la Figura 1.9 se muestran los resultados obtenidos.

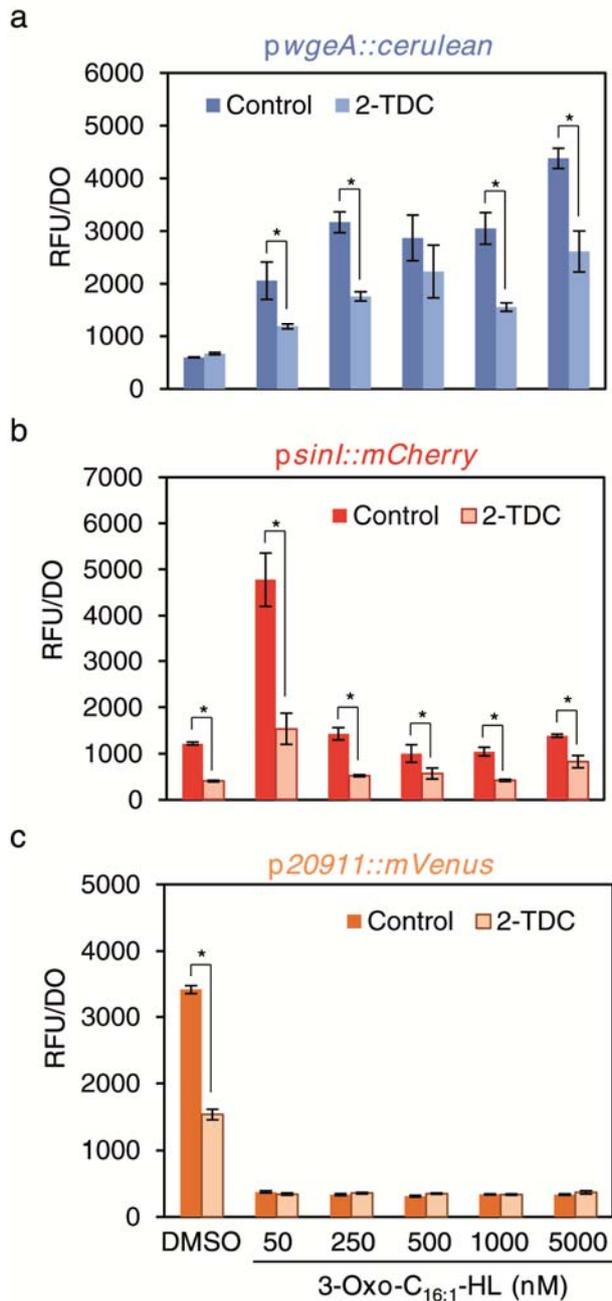


Figura 1.7: Efecto de la 2-TDC en la expresión de genes QS en respuesta a 3-Oxo-C16:1-HL en medio semisólido.

La cepa *Smais* se creció en placas de MM_{AN} (1% agar) conteniendo distintas concentraciones de la AHL preparada en DMSO. Para el tratamiento con la MK se añadió a las placas 20 μ l de 2-TDC preparada a 50 mM (1 μ mol) o la misma cantidad de etanol como control. Los gráficos muestran la fluorescencia emitida por las fusiones transcripcionales *pwgeA::cerulean* (a), *psinI::mCherry* (b) y *p20911::mVenus* (c) en las distintas condiciones testadas. Las barras representan el error estándar de la media, calculado a partir de dos experimentos independientes con al menos dos réplicas técnicas. El asterisco indica diferencias significativas entre el tratamiento con 2-TDC y su control (análisis ANOVA, $P \leq 0,05$).

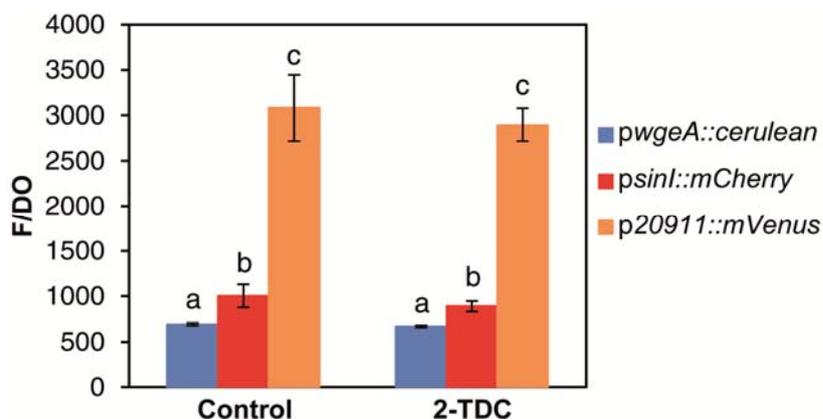


Figura 1.8: Efecto de la 2-TDC en la expresión de genes QS en la cepa Smaiss crecida en condiciones restrictivas de movilidad en superficie. La figura muestra la fluorescencia de las construcciones reporteras *pwgeA::cerulean*, *psinI::mCherry* y *p20911::mVenus* contenidas en la cepa Smaiss. Dicha cepa se cultivó durante 24 horas en MM_{AP} (1,3% de agar) en presencia/ausencia de 1 μ mol de 2-TDC. Las diferencias estadísticas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$) se indican con diferentes letras, a partir de datos obtenidos de dos experimentos independientes con cuatro réplicas técnicas.

Aunque no se indica en la figura, tanto GR4 como GR4A presentaron un crecimiento casi idéntico en todas las condiciones testadas. En las condiciones control (MM sin tratar o tratado con 0,1% etanol), el comportamiento de las fusiones mostró que tanto GR4 como GR4A acumulaban AHL durante las primeras horas de crecimiento. A partir de las primeras 24 horas comenzaban a desaparecer las AHL del sobrenadante de GR4, mientras que para GR4A este proceso comenzaba a las 32 horas de cultivo (Figuras 1.9a y 1.9b, MM y EtOH). Esto indica que, alcanzado un determinado estado de crecimiento, las AHL son degradadas. De las tres fusiones traduccionales que responden frente a la presencia/ausencia de AHL, las más sensibles a las variaciones en el contenido parecen ser *psinI::mCherry* y *p20911::mVenus*, ya que la fusión de *wgeA* al gen *cerulean* apenas varía su expresión a lo largo del tiempo.

La respuesta de la cepa indicadora Smaiss a los sobrenadantes de los cultivos de GR4 tratados con 2-TDC sugiere que en esas condiciones hay una acumulación de AHL, y que esta acumulación es mayor cuanto mayor es la concentración de la metilcetona (Figura 1.9a). Con 50 y 500 μ M 2-TDC vemos que la expresión del gen *sinI* es mayor que en el control con etanol, y que esa expresión comienza a caer más tardíamente. Esto es especialmente llamativo con 500 μ M, donde el gen *sinI* está claramente más inducido, y el nivel de fluorescencia no empieza a disminuir hasta las

48 horas de cultivo. El mismo patrón pero a la inversa se observa en la fusión del gen *smb20911*, que recordemos que se reprime en presencia de AHL; la expresión de este gen comienza a subir más tardíamente cuanto mayor es la concentración de 2-TDC presente en el medio. Una vez más se pone de manifiesto la distinta sensibilidad de cada fusión reportera, ya que para *p20911::mVenus* se observan pequeñas diferencias en expresión con respecto al control incluso con 10 μM de 2-TDC, mientras que *pwgeA::cerulean* sólo reacciona incrementando la fluorescencia con el sobrenadante de cultivos crecidos en presencia de 500 μM de 2-TDC y en principio es más rico en AHL.

Resultados similares se obtuvieron en los cultivos de GR4A, indicando que no hay grandes variaciones en el comportamiento de una cepa *expR* o *expR*⁺. También en este caso la 2-TDC indujo la acumulación de AHL en el sobrenadante de un modo dependiente de dosis (Figura 1.9b). Especialmente, en la cinética de expresión de *smb20911* (fusión *p20911::mVenus*), se observa que en todo momento hay mayor contenido de AHL en los cultivos tratados con 2-TDC.

Por lo tanto, aunque la 2-TDC no actúe modulando la actividad transcripcional del gen *sinI*, parece que sí altera el contenido en AHL de *S. meliloti*, provocando que se acumule mayor cantidad de estas moléculas señal. Esta mayor acumulación podría ser la responsable de la ligera bajada en expresión detectada en *sinI* en presencia de la MK (Figuras 1.5c y 1.5d), dado que se podría estar generando algún tipo de *feedback* negativo.

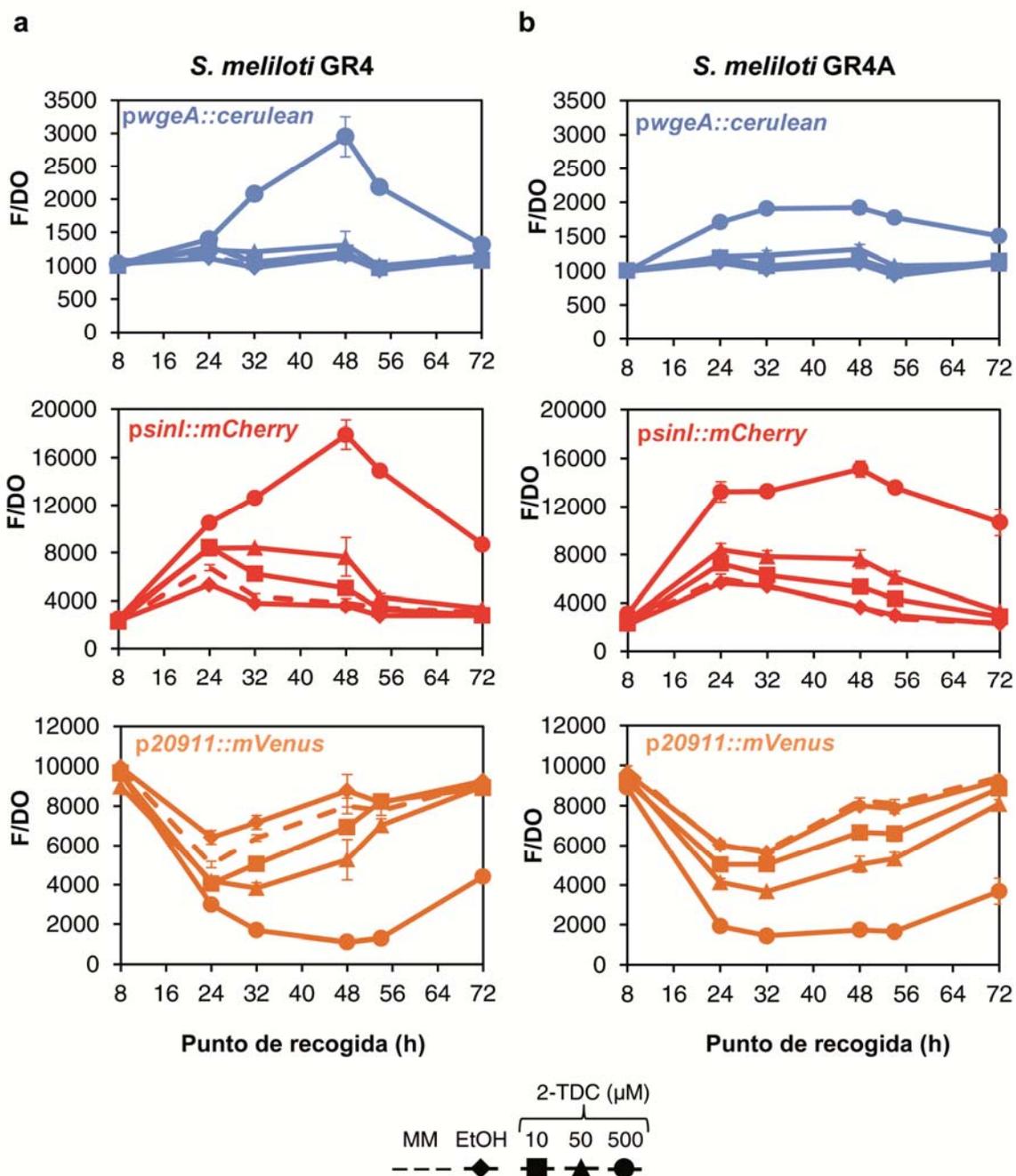


Figura 1.9: La presencia de 2-TDC induce la acumulación de AHL en *S. meliloti*. Se incubó durante 24 horas a la cepa indicadora Smais con sobrenadante de cultivo de GR4 (**a**) y GR4A (**b**) crecidos en cultivo líquido en distintas condiciones: MM sin tratar (MM), MM tratado con 0,1% de etanol (EtOH) y MM conteniendo 10, 50 y 500 μM de 2-TDC. Los gráficos muestran un experimento representativo de dos realizados de la respuesta en fluorescencia mostrada por la cepa indicadora.

Con objeto de evaluar si la acumulación de AHL provocada por el crecimiento en presencia de 2-TDC es consecuencia de un incremento en la síntesis y/o un bloqueo en el consumo de AHL, nos propusimos analizar el comportamiento de un mutante en el gen *sinI* de la cepa GR4 crecido en presencia de la homoserina lactona sintética.

Esta cepa es incapaz de sintetizar AHL pero sí podría degradar AHL exógenas. Para estos experimentos y por una cuestión de mayor simplicidad metodológica (ver Materiales y Métodos), se utilizó otra cepa reportera, *Agrobacterium tumefaciens* NTL4+ (pZLR4). Esta cepa contiene el plásmido pZLR4, donde se encuentra la fusión transcripcional *traG::lacZ* que se activa en presencia de AHL, y además expresa el gen *fadL* de *S. meliloti* que codifica una proteína que facilita el transporte de AHL de cadena larga, lo que mejora la detección de este tipo de moléculas (Krol & Becker 2014; Shaw *et al.* 1997). La cepa reportera de *Agrobacterium* se incubó con muestras recogidas a distintos tiempos procedentes de cultivos de la cepa GR4sinI crecidos en MM líquido conteniendo AHL y en presencia/ausencia de 2-TDC.

En primer lugar, se hicieron experimentos para corroborar en la cepa de *Agrobacterium* los resultados obtenidos con Smais para GR4. En este caso, sólo se probó a añadir 50 y 500 μM de la MK al cultivo bacteriano, y no solamente se incubó la cepa indicadora con extractos del sobrenadante, sino también del pellet celular. Para descartar posibles efectos causados por diferencias en crecimiento, en cada tiempo de recogida (24, 48 y 72 horas) se midió la absorbancia de los cultivos. De nuevo, los resultados sugieren que la 2-TDC provoca una acumulación de AHL y que éstas, que desaparecen con el tiempo de incubación, lo hacen a menor ritmo en presencia de la MK en comparación al control (Figura 1.10). Esto se vio tanto para muestras procedentes de sobrenadante como de pellet, y también se vio el efecto de la concentración, ya que el contenido en AHL con 500 μM de 2-TDC no disminuyó nada a lo largo del tiempo (Figuras 1.10b y 1.10c).

Como cabía esperar, no se detectó actividad en las muestras procedentes del mutante *sinI* de GR4 crecido en ausencia de la AHL, independientemente del tratamiento de 2-TDC utilizado (Figura 1.11b). Cuando dicho mutante creció en presencia de 5 μM de 3-oxo-C_{16:1}-HL, de nuevo se observó que, mientras en la situación control con etanol el contenido de AHL en sobrenadante y pellet iba disminuyendo con el tiempo, la presencia de 2-TDC interfería con el proceso de degradación (Figuras 1.11c y 1.11d).

Estos resultados, junto a los análisis de expresión del gen *sinI*, indican que la acumulación de AHL en *S. meliloti* inducida por la 2-TDC no es el resultado de un incremento en la síntesis, sino que más bien se debe a que la metilcetona ejerce un efecto negativo en el proceso de degradación de AHL.

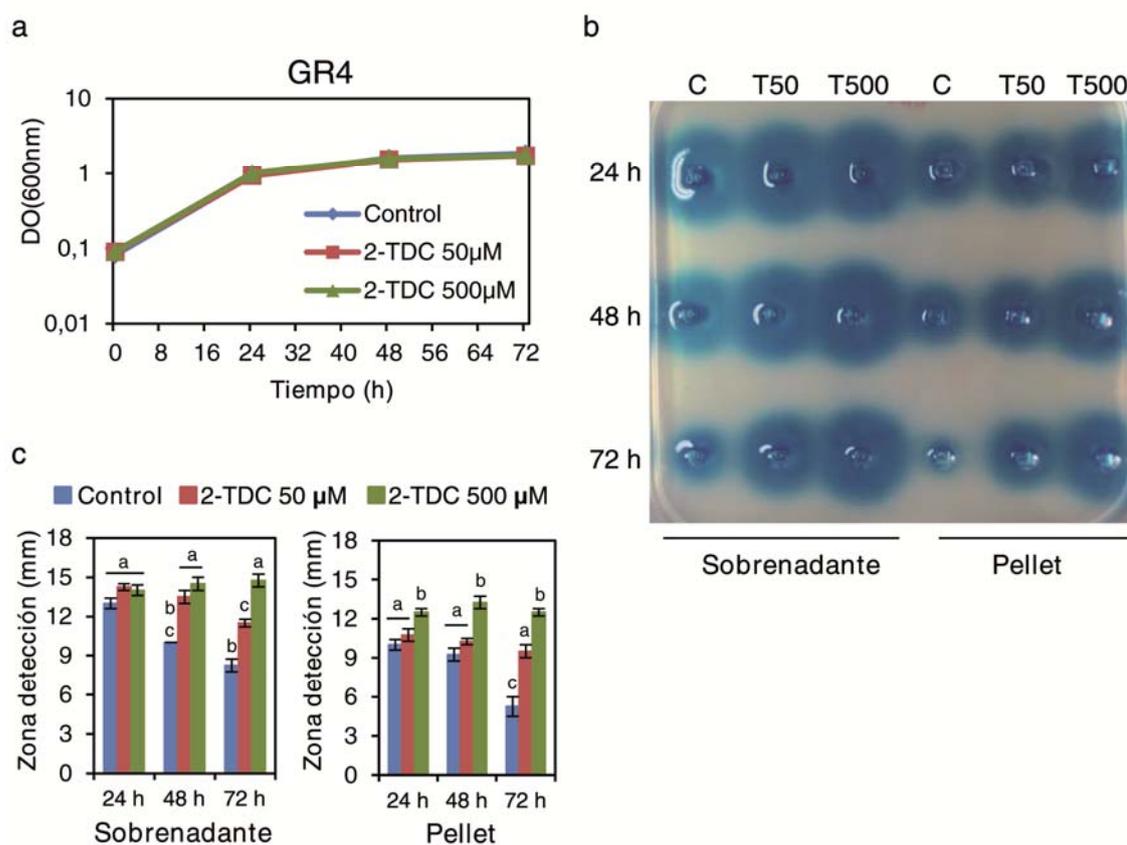


Figura 1.10: Detección de AHL en *S. meliloti* GR4 en presencia de 2-TDC. (a) Curva de crecimiento de GR4 en MM líquido en presencia de 2-TDC 50 (T50) y 500 (T500) μM o 0,1% etanol (Control, C). (b) Imagen representativa del bioensayo con la cepa reportera *A. tumefaciens* NTL4+ (pZLR). En cada pocillo se inocularon 18 μl de muestra. (c) Diámetro medio del halo de actividad β -galactosidasa a partir de dos experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar y las diferencias significativas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$) se indican con letras diferentes.

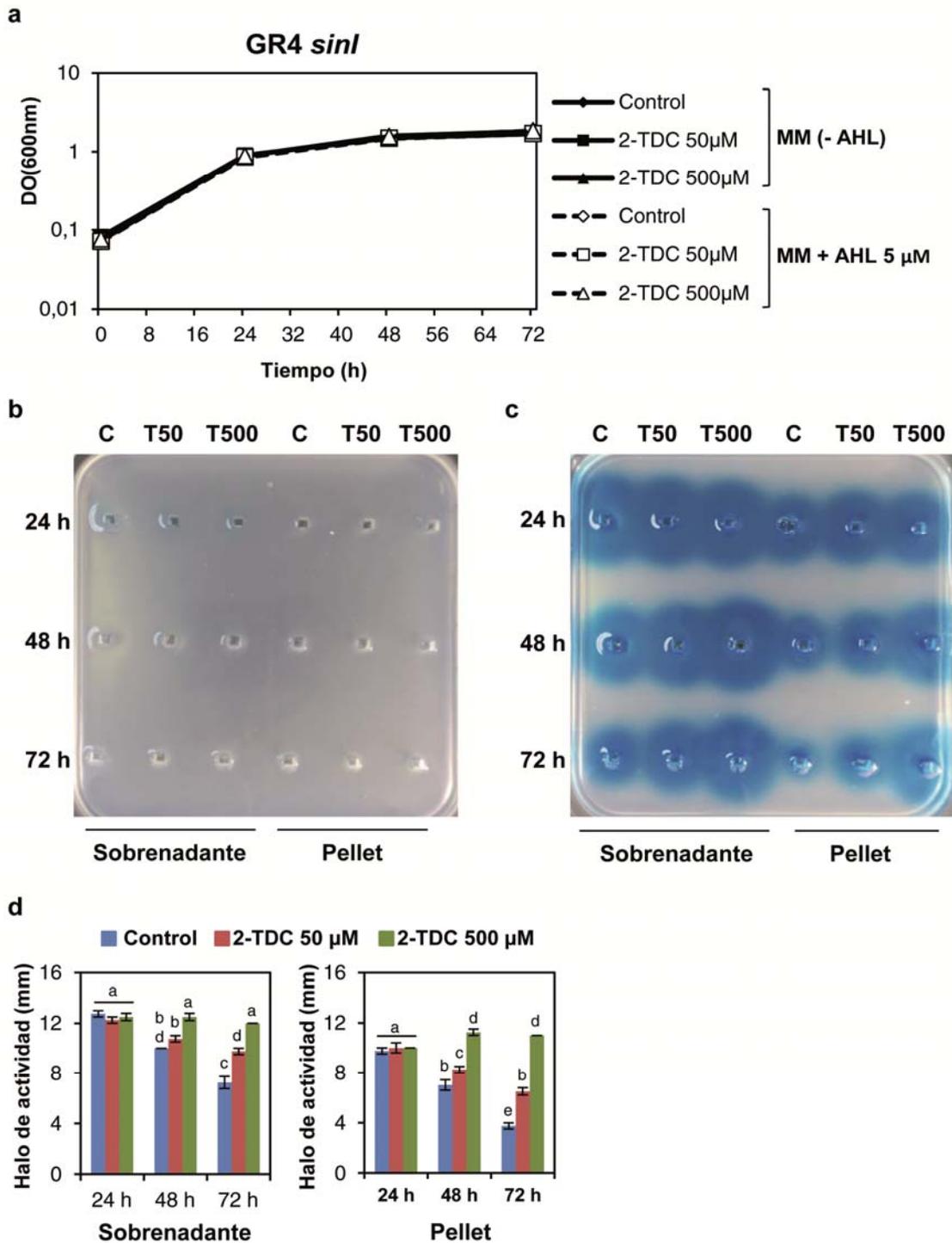


Figura 1.11: Detección de AHL en un mutante *sinI* de *S. meliloti* GR4 en presencia de 2-TDC. La cepa mutante se creció en MM líquido sin (- AHL) o con 5 μM de 3-oxo-C_{16:1}-HL (AHL) junto con los distintos tratamientos: 2-TDC a 50 (T50) y 500 (T500) μM y etanol al 0,1% (Control, C). **(a)** Curva de crecimiento de GR4 *sinI* crecido en las distintas condiciones. Imágenes representativas del bioensayo con la cepa reportera *A. tumefaciens* NTL4+ (pZLR). En cada pocillo se inocularon 18 μl de muestras procedentes del cultivo sin **(b)** o con **(c)** AHL y los distintos tratamientos con 2-TDC. **(d)** Cuantificación del diámetro medio del halo de actividad β-galactosidasa a partir de dos experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar y las diferencias significativas de acuerdo a un análisis ANOVA (P≤0,05) se indican con letras diferentes.

1.5. La 2-Tridecanona interfiere negativamente con la capacidad simbiótica de *S. meliloti*.

Hasta ahora hemos visto cómo cepas silvestres de *S. meliloti* crecidas en presencia de 2-TDC presentan los mismos fenotipos que sus respectivas derivadas mutantes en el gen *fadD* (incremento de la movilidad en superficie y menor capacidad de formar biopelículas), lo cual sugiere que es la acumulación de esta MK la responsable de los fenotipos mostrados por dichos mutantes.

Para estudiar si la acumulación de 2-TDC pudiera ser responsable también del defecto en simbiosis que exhiben los mutantes *fadD* (Soto *et al*, 2002), decidimos llevar a cabo ensayos de nodulación de plantas de alfalfa, tanto con *S. meliloti* GR4 como con Rm1021, en presencia/ausencia de dicho compuesto. Los ensayos se realizaron en condiciones de cultivo hidropónico, adicionando a la solución mineral de las plantas 5 y 25 μM de 2-TDC en el momento de la inoculación con el rizobio. Posteriormente se evaluó el número medio de nódulos por planta a lo largo del tiempo, así como también el porcentaje de plantas noduladas. Para simplificar, los resultados que se muestran de estas cinéticas de nodulación hacen referencia solamente a GR4, aunque se obtuvo lo mismo para Rm1021.

En primer lugar hay que señalar que por lo general, la adición de etanol no afectó la capacidad simbiótica de las cepas utilizadas ni provocó alteraciones en el aspecto de las plantas en comparación a la situación normal sin tratamiento (datos no mostrados). La presencia de 2-TDC provocó un claro retraso en la aparición de los primeros nódulos, así como una reducción significativa tanto del número medio de nódulos desarrollados por planta, como en el porcentaje de plantas noduladas a lo largo del tiempo (Figura 1.12). Además, este efecto se correlacionó con la dosis aplicada, siendo más llamativo con 25 μM . A pesar de ello, el aspecto que mostraban las plantas tratadas con 2-TDC al final del experimento no difería del de las plantas control, con lo que, aunque se formasen menos nódulos, aparentemente la actividad fijadora de los mismos era suficiente para el aporte de nutrientes requerido por las plantas.

Este efecto negativo en la tasa de nodulación también se vio cuando se aplicó el tratamiento con 25 μM de 2-TDC días antes de la inoculación con *S. meliloti* GR4 (Figuras 1.13a y 1.13b). Incluso, añadiendo la MK dos días después de haber inoculado con el rizobio se pudo observar un retraso significativo en la formación de nódulos (Figura 1.13c). Sin embargo, la adición de 2-TDC cuatro días después de la

inoculación con la bacteria, tiempo al que ya empiezan a aparecer los primeros nódulos, no produjo un efecto significativo (Figura 1.13d). Esto indica que la 2-TDC tiene efectos sólo en etapas tempranas de la interacción entre *S. meliloti* y alfalfa.

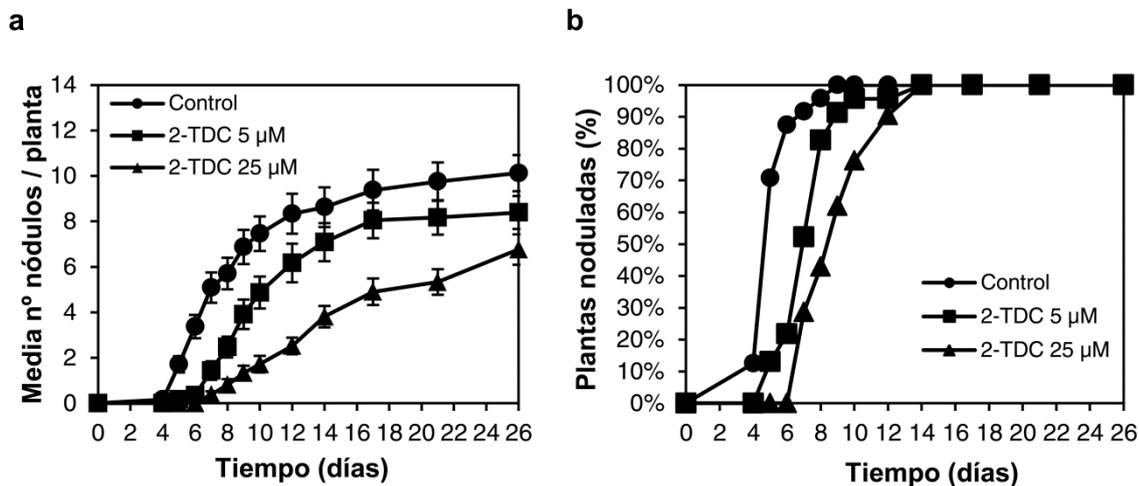


Figura 1.12: La 2-TDC interfiere negativamente con la nodulación de plantas de alfalfa. Cinéticas de nodulación de plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* GR4 en presencia de distintas concentraciones de 2-TDC (o etanol como control). Se midió tanto el número medio de nódulos por planta (**a**) como el porcentaje de plantas noduladas (**b**) a lo largo del tiempo. La 2-TDC se aplicó en el mismo momento de inocular la bacteria, partiendo de soluciones en etanol 1000 veces concentradas. Las barras de error representan el error estándar de la media, calculada a partir de veinte réplicas independientes. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

Ya se ha indicado que las cepas de *S. meliloti* experimentan el mismo crecimiento en presencia que en ausencia de 2-TDC, por lo que el defecto en simbiosis no podría explicarse por un efecto bactericida o bacteriostático de la MK. Tampoco la causa de este retraso se encuentra en defectos en expresión de los genes *nod*, como así revelaron una serie de ensayos de expresión génica llevados a cabo en nuestro laboratorio (Durán 2015).

Puesto que ni el crecimiento ni la expresión de los genes *nod* están negativamente afectados por la 2-TDC en *S. meliloti*, pero sí la capacidad de formar biopelículas sobre superficie abiótica, nos propusimos analizar si la causa del retraso en la nodulación tenía su origen en un defecto por parte de la bacteria a la hora de colonizar las raíces. Efectivamente, la metilcetona interfiere negativamente con la capacidad de la bacteria para colonizar de manera eficiente las raíces de alfalfa, especialmente en las primeras 24 horas tras la inoculación, donde el número de células adheridas a la raíz se redujo unas 100 veces con respecto al control (Figura 1.14). Estos resultados, que concuerdan con la menor formación de biofilm que muestra *S. meliloti* en

presencia de 2-TDC, podrían ser una de las causas de la menor eficiencia en nodulación.

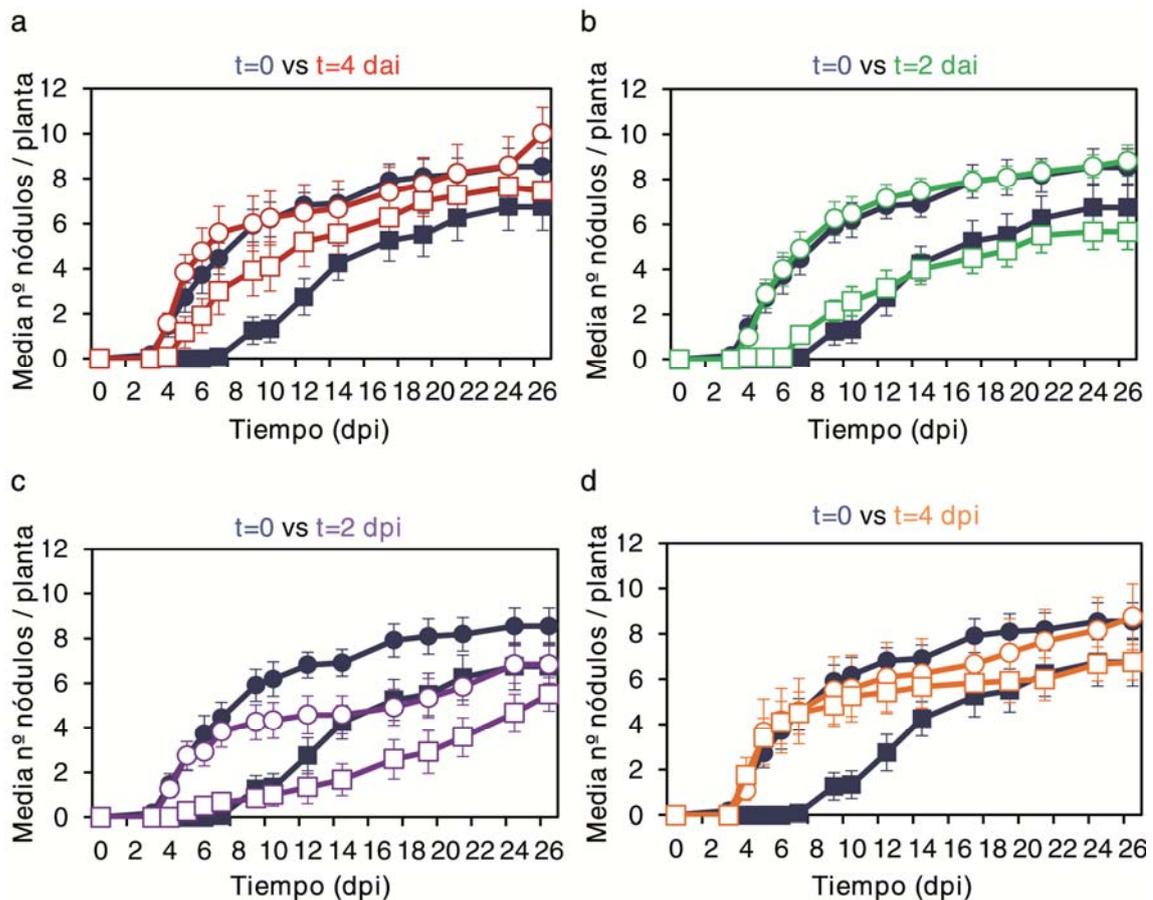


Figura 1.13: La inhibición de la nodulación causada por la 2-TDC requiere de la presencia de ésta en etapas tempranas de la interacción simbiótica. Comparación de las cinéticas de nodulación de plantas de alfalfa tratadas con etanol (0,1%) (control, círculos) o 2-TDC (25 μM) (cuadrados) en el mismo momento de inocular con *S. meliloti* GR4 (t=0, símbolos con relleno), frente a las cinéticas mostradas por plantas de alfalfa a las que los mismos tratamientos se les aplicaron: **(a)** 4 días antes de la inoculación (4 dai), **(b)** 2 días antes de la inoculación (2 dai), **(c)** 2 días después de la inoculación (2 dpi) y **(d)** 4 días después de la inoculación (4 dpi) (símbolos sin relleno). Las barras representan el error estándar de doce réplicas independientes (se muestra un experimento representativo de un total de 3 llevados a cabo).

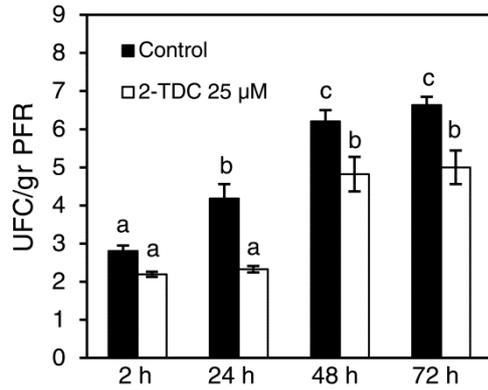


Figura 1.14: La 2-TDC reduce la eficiencia de *S. meliloti* de colonizar las raíces. El gráfico muestra el número de células adheridas íntimamente a las raíces de alfalfa expresado como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de peso fresco de raíz (PFR). Se representa la media de UFC/gr PFR obtenida a partir de tres grupos de 5 plantas cada uno para cada tratamiento (2-TDC 25 µM o etanol al 0,1%). Las barras de error indican el error estándar de la media. Los valores que no difieren

significativamente de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0.05$) están señalados con la misma letra.

En resumen, la 2-TDC afecta negativamente a la interacción *Rhizobium-leguminosa*, dificultando el proceso de colonización por parte de la bacteria.

1.5.1. El efecto negativo en simbiosis de la 2-TDC podría ser ejercido a través de la planta

En el apartado anterior se ha indicado que la interferencia causada por la 2-TDC en la nodulación podría ser debida al incremento en movilidad y reducción del biofilm en *S. meliloti*, lo que provocaría una colonización menos eficiente de la raíz por parte de la bacteria. Sin embargo, también cabe la posibilidad de que la MK ejerza algún efecto sobre la planta que repercuta negativamente en la simbiosis.

Para evaluar si el retraso en nodulación causado por la 2-TDC es inducido únicamente a través de la bacteria o si la MK afecta también a la planta, llevamos a cabo ensayos de nodulación de alfalfa con *S. meliloti* GR4 en los que las plantas fueron pre-tratadas con 2-TDC antes de la inoculación con la bacteria. Así, cuatro días antes de la inoculación con GR4, se adicionó a la solución mineral de las plantas 2-TDC a una concentración final de 25 µM o etanol como tratamiento control. Posteriormente y coincidiendo con el día de inoculación, se sustituyó la solución mineral por solución mineral nueva y libre de cualquier tratamiento. El recuento del número de nódulos a lo largo del tiempo mostró que aquellas plantas que habían estado en contacto con la 2-TDC formaban menos nódulos y a menor velocidad que las plantas con el tratamiento control (Figura 1.15).

Estos resultados muestran que no es necesario que la 2-TDC esté presente en el medio justo en el momento de la inoculación, y evidencian que, si bien no es descartable un efecto negativo directo en la capacidad colonizadora de *S. meliloti*, la 2-TDC tiene un efecto sobre la planta, que interfiere en un proceso infectivo eficiente. No parece que dicho efecto sea algo sistémico; en experimentos de nodulación donde la MK se aplicó pulverizando la parte aérea de las plantas de alfalfa, no se observó retraso en la formación de nódulos con respecto al tratamiento control con etanol (datos no mostrados).

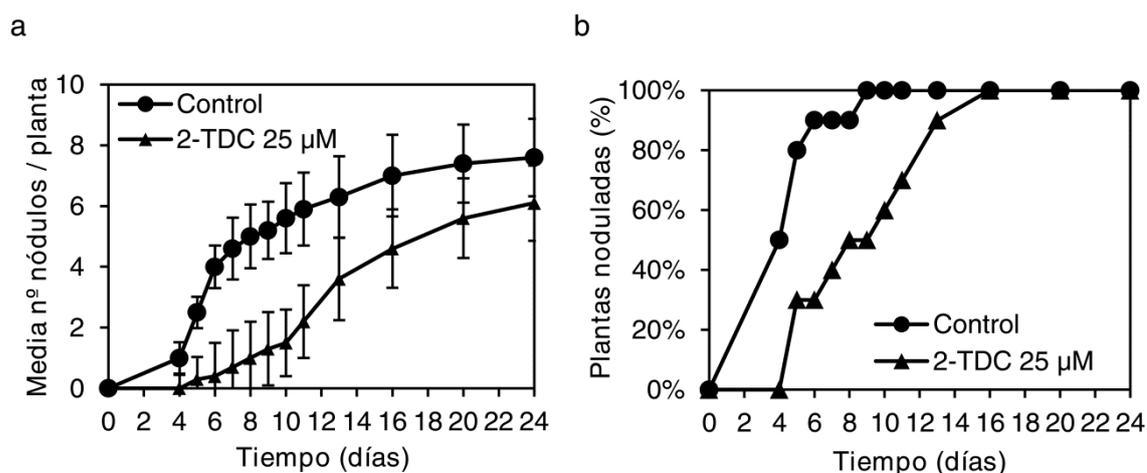


Figura 1.15: Cinética de nodulación de plantas de alfalfa crecidas en cultivo hidropónico e inoculadas con *S. meliloti* GR4, en la que se muestra el número medio de nódulos por planta **(a)** y el porcentaje de plantas noduladas **(b)** a lo largo del tiempo. Previamente a la inoculación las plantas fueron tratadas durante 4 días con etanol al 0,1% (Control, círculos) o con 2-TDC a 25 μ M (triángulos), y los tratamientos se retiraron el mismo día de la inoculación. La figura corresponde a un experimento representativo de dos llevados a cabo. Las barras de error representan el error estándar de la media, calculada a partir de al menos diez réplicas independientes.

1.6. Efecto de la 2-Tridecanona sobre fenotipos asociados al crecimiento en superficie en otras bacterias.

Se han descrito diferentes señales químicas de naturaleza volátil que son capaces de transmitirse por el aire y que están implicadas en señalización entre bacterias, tanto dentro de la misma especie como entre especies distintas. Estas moléculas señalan afectan a comportamientos bacterianos tan importantes como la movilidad, la formación de biopelículas, la resistencia frente agentes antimicrobianos y la virulencia. (Schmidt *et al.* 2015; Audrain *et al.* 2015a, 2015b; Kim *et al.* 2013). Para analizar si la

2-TDC también influía en este tipo de comportamientos en otros microbios además de *S. meliloti*, se estudió la movilidad y la formación de biofilm en presencia de esta MK en algunas bacterias patógenas de plantas (*Pseudomonas syringae*) y animales (*Salmonella enterica* y *Pseudomonas aeruginosa*). Los ensayos con *P. aeruginosa* se hicieron en colaboración con el grupo del Dr. Miguel Cámara de la Universidad de Nottingham (Reino Unido).

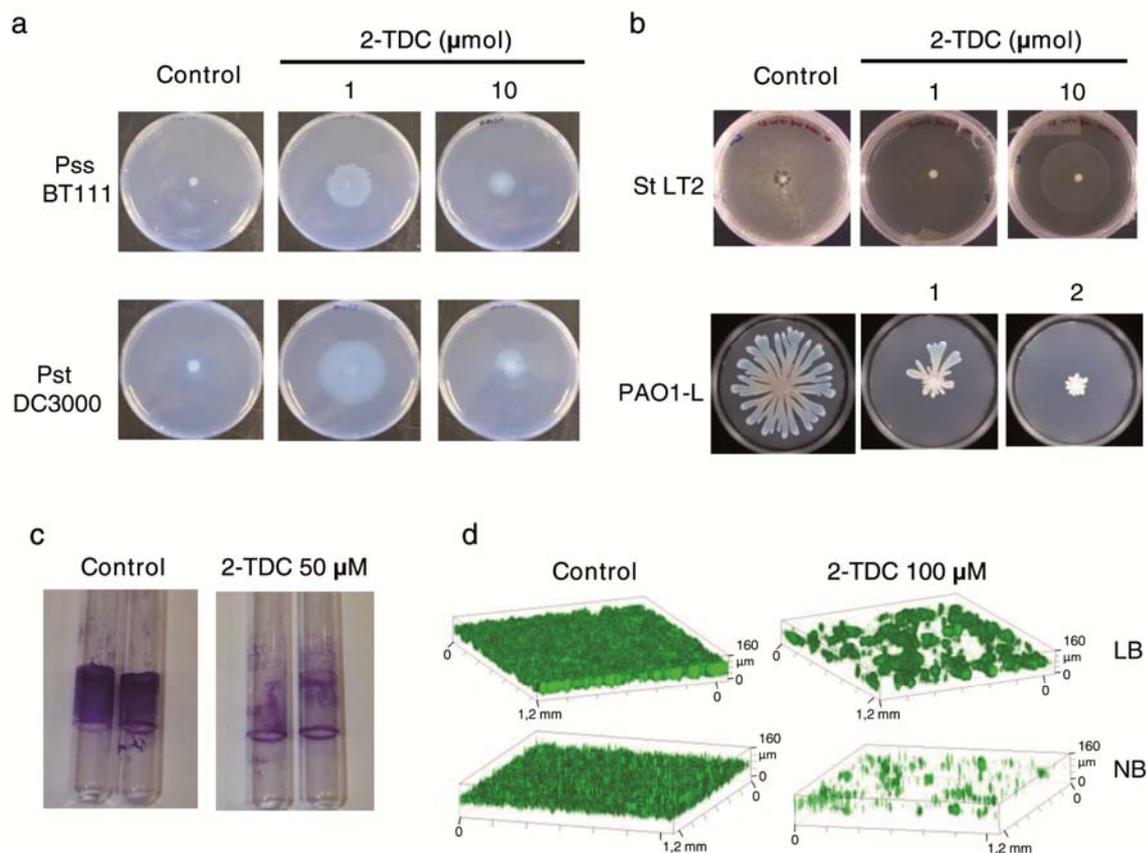


Figura 1.16: Efecto de la 2-TDC sobre comportamientos asociados a superficie en bacterias patógenas. La figura muestra la movilidad en superficie de (a) *P. syringae* pv. *syringae* Pss BT111 (patógeno de judía y soja) y pv. *tomato* Pst DC3000 (patógeno de tomate) y (b) *S. entérica* y *P. aeruginosa* PAO1-L en respuesta a diferentes cantidades (μmol) de 2-TDC aplicada como volátil en la tapa de la placa Petri. Como control se aplicó etanol. (c) Efecto de la 2-TDC en la biopelícula formada por *P. syringae* Pss BT111 crecida en LB durante 24 horas. (d) Proyecciones tridimensionales reconstruidas a partir de imágenes obtenidas al microscopio confocal de las biopelículas formadas por *P. aeruginosa* PAO1-L marcada con el gen *gfp* (Imágenes cedidas por la Dra. Diana Palenzuela). El ensayo de formación de biofilm se hizo con la bacteria crecida de 16 a 20 horas en LB o NB en presencia de 2-TDC (100 μM) o etanol como control.

Como se muestra en la Figura 1.16, la 2-TDC aplicada como volátil incrementó el desplazamiento en superficie de los patovares *syringae* (Pss) y *tomato* (Pst) de *P.*

syringae (Figura 1.16a). Por el contrario, la MK inhibía el *swarming* de *S. enterica* serovar Typhimurium y *P. aeruginosa* (Figura 1.16b).

Cuando se analizó la influencia de la 2-TDC en la formación de biofilm en *P. syringae* Pss BT111, patógeno de judía y soja, se vio que la presencia de la MK disminuía la habilidad de la bacteria de desarrollar biopelículas firmemente adheridas a la superficie de vidrio (Figura 1.16c). Igualmente, el biofilm desarrollado sobre superficie de vidrio por *P. aeruginosa* se inhibió significativamente con 2-TDC tanto en medio rico LB como en medio definido NB (Figura 1.16d).

Experimentos llevados a cabo en el grupo del Dr. Cámara para intentar conocer los mecanismos moleculares por los que la 2-TDC ejerce su efecto sobre *P. aeruginosa*, han determinado que ni la producción de ramnolípidos, ni los niveles de di-GMPc, ni la producción de exopolisacáridos, todos ellos determinantes de la movilidad y la formación de biopelículas en esta bacteria, están afectados por la MK. Sí parece que hay un cierto efecto negativo en la expresión de los genes QS *rhII* y *pqsA*, lo cual podría explicar el efecto negativo de la 2-TDC en el biofilm de *P. aeruginosa* (datos no mostrados).

1.7. La aplicación de 2-TDC en plantas de tomate protege de la infección por el patógeno *P. syringae* pv. *tomato*.

Teniendo en cuenta los fenotipos a los que afecta la 2-TDC en las distintas bacterias estudiadas, se decidió investigar si, al igual que ocurre con la simbiosis, la MK interfiere con el establecimiento de interacciones patogénicas. Para ello, se evaluó cómo afectaba la aplicación de 2-TDC al proceso infectivo de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Pst DC3000) con plantas de tomate. Pst DC3000 causa la enfermedad conocida como peca bacteriana en dichas plantas y es empleada como modelo de estudio en patología vegetal.

Curiosamente, en los ensayos llevados a cabo en nuestro grupo los síntomas de la enfermedad (aparición de puntos necróticos en las hojas), así como el crecimiento de Pst DC3000 dentro de los tejidos foliares, se vieron significativamente reducidos en aquellas plantas de tomate cuyas hojas habían sido pulverizadas con 2-TDC en el momento de la inoculación con la bacteria (Figuras 1.17a y 1.17b).

Con estos resultados podemos decir que la presencia de 2-TDC durante etapas tempranas de interacciones planta-bacteria protege a las plantas de la infección por parte del microbio.

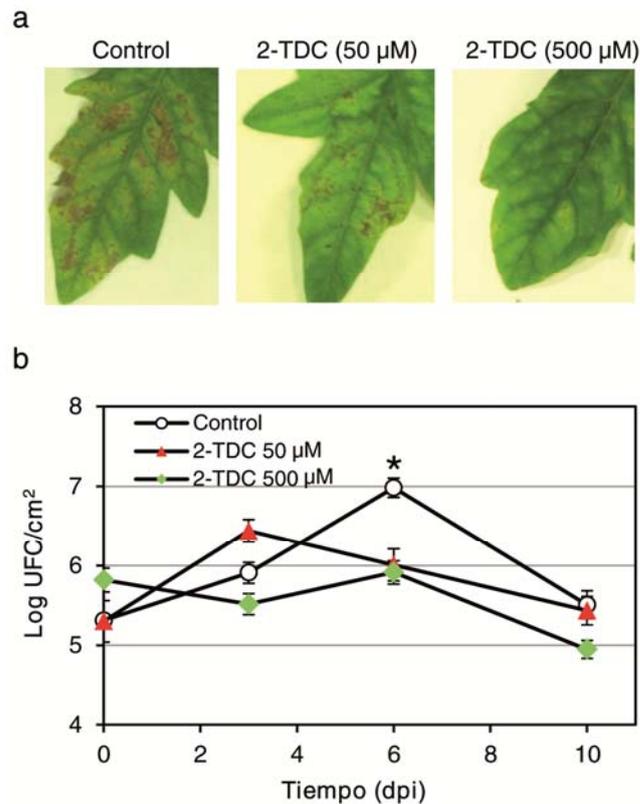


Figura 1.17: Plantas de tomate tratadas con 2-TDC son más resistentes al desarrollo de peca bacteriana. (a) Síntomas de la peca bacteriana desarrollados por hojas de tomate 10 días después de la inoculación con una suspensión de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (10^6 UFC/ml) en ausencia o presencia de 2-TDC (50 y 500 μ M). Los distintos tratamientos se aplicaron mediante rociado en spray en el momento de la inoculación con la bacteria. Las plantas control se trataron con una cantidad equivalente de etanol (0,1%). Se observa cómo la 2-TDC reduce los síntomas de un modo dependiente de dosis. (b) Crecimiento de *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 en hojas de tomate a lo largo del tiempo. Se determinó el número de UFC a las 3 horas (tiempo = 0) y a los 3, 6 y 10 días tras la inoculación. Los datos representan la media y el error estándar obtenidos a partir de al menos tres medidas diferentes. El asterisco indica que hay diferencias significativas con respecto al tratamiento control (análisis ANOVA, $P \leq 0,05$).

1.8. La cepa GR4 de *S. meliloti* produce 2-Tridecanona.

La primera vez que se detectó 2-TDC en *S. meliloti* fue en sobrenadantes de cultivos de un mutante en el gen *fadD* de la cepa GR4 crecido hasta fase estacionaria ($DO_{600nm} = 1,2$) en un medio definido (medio mínimo de Sherwood) a 30 °C (López-Lara *et al.* sometido). En estas condiciones de crecimiento y con el proceso de análisis utilizado (separación cromatográfica de extractos lipídicos y posterior análisis de distintas fracciones por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)), no pudo detectarse la presencia de la MK en cultivos de la cepa silvestre. Esto podría interpretarse como que la cepa silvestre no puede producir 2-TDC, o bien que las condiciones experimentales utilizadas no son las ideales para detectar la presencia de la MK en GR4. De hecho, es conocido que la producción y emisión de volátiles bacterianos se encuentra regulada por numerosos factores relacionados con el crecimiento de la bacteria, tales como composición del medio de cultivo o la fase de crecimiento (revisado en Audrain *et al.* 2015a).

El creciente interés de la comunidad científica por el estudio de compuestos volátiles producidos por microorganismos y seres vivos superiores, ha dado lugar al desarrollo de metodologías cada vez más especializadas y adaptadas a este tipo de compuestos, más sensibles y que permitan una mejor obtención y análisis de las muestras tanto *in vitro* como en el ambiente natural. Éste es el caso de la técnica de microextracción en fase sólida o SPME (*Solid-Phase Microextraction*). Esta técnica permite la extracción de compuestos químicos sin necesidad de utilizar solventes orgánicos, ya que se vale del uso de una fibra recubierta por un polímero que actúa como adsorbente, y al que se adhieren los analitos en función de su naturaleza química. De esta manera se pueden extraer compuestos que se encuentren tanto en fase líquida como en fase gaseosa (Semenov *et al.* 2000). Esta técnica se puede acoplar después con técnicas analíticas como GC-MS, ya que la columna se puede inyectar directamente al instrumento de separación para la desorción de los analitos.

La disponibilidad de esta metodología en el laboratorio nos llevó a plantearnos analizar la producción de 2-TDC volátil en GR4 y su derivado *fadD* tras crecimiento en la superficie de medio semisólido, y en condiciones similares a las utilizadas para observar promoción de movilidad en respuesta a la MK. Utilizando esta metodología fue posible detectar la presencia en las dos cepas, mutante *fadD* y silvestre, de un pico identificado como 2-TDC, tanto por la coincidencia del espectro de fragmentación como en el tiempo de retención con los de patrón puro (Figura 1.18). El área del pico detectado en el mutante *fadD*, que se corresponde con la producción de 76.7 ± 4.1 ng

de 2-TDC, era 7.6 veces mayor que la obtenida en el caso de la cepa silvestre, donde la cuantificación no fue posible por encontrarse por debajo del límite de cuantificación en nuestras condiciones experimentales (producción inferior a 20 ng de 2-TDC). Por lo tanto, mediante el empleo de esta nueva metodología, podemos confirmar que la cepa silvestre *S. meliloti* GR4 produce 2-TDC volátil y que la actividad FadD controla su producción.

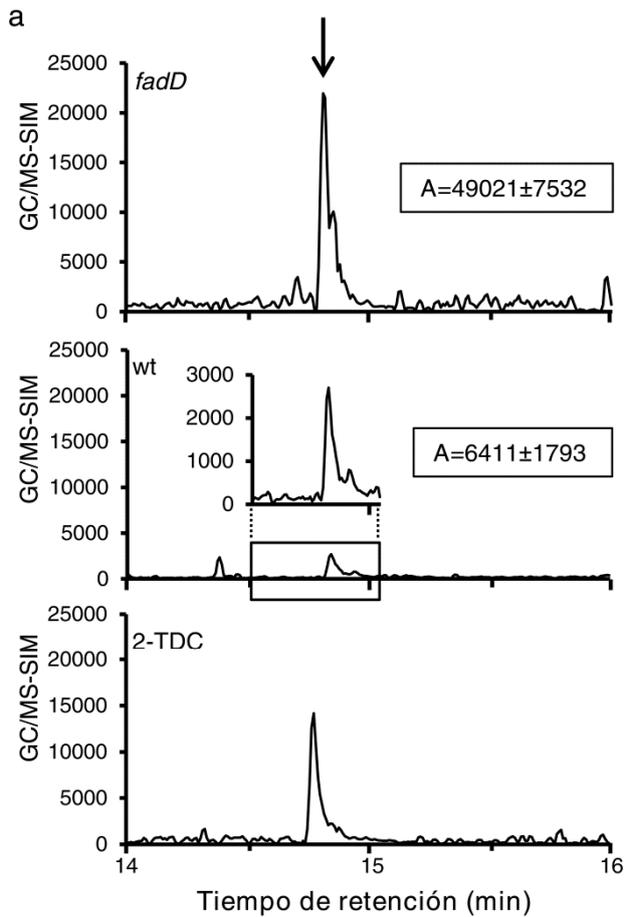
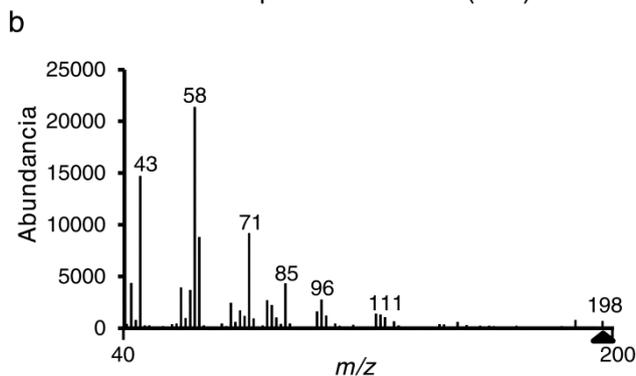


Figura 1.18: Identificación de 2-TDC volátil mediante SPME-GC/MS en cepas de *S. meliloti* crecidas en medio semisólido. (a)

Cromatogramas en el modo selectivo (SIM) para el ión 58 (típico de cetonas) de los volátiles recogidos mediante SPME de células de *S. meliloti* GR4 (wt) y su derivado *fadD* crecidos durante 48 horas en MM_{AN} (1% agar) a 30 °C. Se muestra también el cromatograma para un estándar puro de 2-TDC aplicada en las mismas condiciones. La escala del eje Y se da en unidades arbitrarias. Se indican el área media del pico (A) junto con su error estándar, calculados a partir de al menos cuatro muestras biológicas. (b) Espectro de masas obtenido a partir del pico principal producido por el mutante en *fadD* de *S. meliloti* que confirma que se trata de 2-TDC.



CAPÍTULO 2

**Identificación y caracterización de
genes de *Sinorhizobium meliloti*
implicados en el mecanismo de acción
de la 2-Tridecanona**

2. Identificación y caracterización de genes de *Sinorhizobium meliloti* implicados en el mecanismo de acción de la 2-Tridecanona.

2.1. Obtención y selección de mutantes derivados de *S. meliloti* GR4 afectados en movilidad en superficie en respuesta a 2-TDC.

Como se ha indicado en apartados anteriores, las estirpes silvestres de *S. meliloti* GR4 y Rm1021, ambas empleadas rutinariamente en el laboratorio como modelos de estudio de interacción simbiótica planta-microorganismo, tienen la capacidad de desplazarse en superficie, aunque presentan diferencias importantes en cuanto al mecanismo de regulación de dicha motilidad. En condiciones de crecimiento apropiadas, GR4 presenta una motilidad totalmente dependiente de flagelos, motilidad *swarming* propiamente dicha (Bernabéu-Roda *et al.* 2015). En cambio, el mecanismo empleado por Rm1021 es una mezcla de *swarming* y motilidad independiente de flagelos (Bernabéu-Roda *et al.* 2015; Nogales *et al.* 2012). Independientemente de estas diferencias, una mutación por pérdida de función del gen *fadD*, que da lugar a un incremento en los niveles de 2-TDC como se ha mencionado en el Capítulo 1, incrementa la motilidad en superficie en ambas cepas (Bernabéu-Roda *et al.* 2015; Nogales *et al.* 2010; Soto *et al.* 2002). Además de la aproximación bioquímica que condujo al descubrimiento de la acumulación de 2-TDC como responsable, al menos en parte, de los fenotipos mostrados por mutantes *fadD*, en el grupo de la Dra. Soto se han llevado a cabo distintas aproximaciones genéticas para intentar dilucidar el mecanismo responsable del mayor desplazamiento en superficie inducido por la mutación en *fadD*. Así, mediante una mutagénesis generalizada por inserción de un transposón Tn5 sobre derivados *fadD* tanto de GR4 como de Rm1021, se pudieron obtener mutantes que mostraban alteraciones en la motilidad en superficie con respecto a sus correspondientes cepas parentales. La caracterización genética y fenotípica de estos mutantes reveló el papel fundamental que tiene la movilidad mediada por flagelos en el desplazamiento en superficie de *S. meliloti*, ya que la mayoría de transposantes seleccionados en esta mutagénesis resultaron estar afectados en genes pertenecientes a distintas clases dentro del regulón flagelar (Bernabéu-Roda 2014). Esta mutagénesis ya puso de manifiesto el distinto comportamiento que tienen las cepas GR4 y Rm1021 a la hora de desplazarse en superficie, ya que mientras que para GR4 *fadD* fue posible encontrar mutantes con la movilidad anulada, para Rm1021 *fadD* sólo se pudieron aislar transposantes con movilidad reducida, pero nunca anulada por completo.

Las condiciones en las que se aislaron los transposantes derivados de los mutantes *fadD* en GR4 y Rm1021 se basaban en el uso de medio mínimo suplementado con agar Pronadisa (MM_{AP}) al 0,6% (medio semisólido), medio en el que se identificó por primera vez movilidad *swarming* en *S. meliloti* (Soto *et al.* 2002). Bajo estas condiciones, la cepa silvestre GR4 nunca había mostrado desplazamiento en superficie, mientras que la cepa Rm1021 sí lo hacía con cierta frecuencia (Bernabéu-Roda *et al.* 2015; Nogales *et al.* 2010). La adición de 2-TDC, al igual que la pérdida de función de *fadD*, inducía el desplazamiento de GR4 crecido en estas condiciones e incrementaba el halo de expansión de Rm1021 (Bernabéu-Roda 2014).

Anterior al inicio de este trabajo de Tesis Doctoral, y con el objetivo de identificar determinantes genéticos que formasen parte del mecanismo de acción de la 2-TDC, en el grupo de la Dra. Soto se realizó una mutagénesis generalizada de la cepa GR4, y se seleccionaron transposantes cuya movilidad en superficie de MM_{AP} (0,6%) en presencia de 2-TDC estuviese bloqueada, o al menos reducida. Para el escrutinio de la mutateca, los transposantes se inoculaban mediante picadura en dos placas de MM_{AP} (0,6%); a una placa se le aplicaba el tratamiento con 2-TDC adicionando en la tapa 1 μ mol de la MK; a la otra se le aplicaba etanol (20 μ l) como control. Aquellos transposantes que tras tres ensayos en picadura seguían mostrando una movilidad en superficie en respuesta a 2-TDC claramente reducida respecto a la mostrada por GR4 fueron seleccionados para una posterior caracterización genética y fenotípica. De un total de 5800 transposantes analizados en esta mutagénesis se seleccionaron doce que mostraron una movilidad en superficie reducida o nula en presencia de 2-TDC en comparación a la cepa silvestre. Estos transposantes se identificaron con el código GRS (de *GR4 Reduced Swarming*): GRS1, GRS577, GRS1452, GRS1457, GRS1980, GRS2007, GRS2015, GRS2175, GRS2238, GRS3009, GRS4012 y GRS5662. Sin embargo, las condiciones impuestas por el medio utilizado en la selección (MM_{AP} (0,6%)), hacía imposible discernir si los mutantes seleccionados estaban afectados en la respuesta a la 2-TDC, eran defectivos en translocación en superficie, o ambas cosas.

Posterior a la obtención de los transposantes GRS en agar Pronadisa, se identificó el agar Noble como un agente gelificante que generaba condiciones más permisivas para la movilidad en superficie de *S. meliloti* (Bernabéu-Roda *et al.* 2015). En las nuevas condiciones de ensayo, MM solidificado con agar Noble (MM_{AN}) al 0,6%, la cepa GR4 sí mostraba desplazamiento en superficie (Figura 2.1). De nuevo, la aplicación de 2-TDC incrementaba notablemente el grado de desplazamiento de GR4 en MM_{AN}, incluso utilizando un porcentaje de agar al 1%, una condición que anula

completamente la movilidad de GR4 en condiciones control (Bernabéu-Roda *et al.* 2015; Bernabéu-Roda 2014) (Figura 2.1). A partir de ese momento, todos los experimentos de movilidad se han realizado empleando el agar Noble, y jugando con distintos porcentajes del mismo (0,6 ó 1%) en función de los requerimientos de cada experimento. Así, para los diversos estudios de movilidad con 2-TDC se ha utilizado mayoritariamente un porcentaje del 1%, como se refleja en el Capítulo 1, ya que en estas condiciones GR4 pasa de no mostrar movilidad en condiciones control a moverse como consecuencia de la inducción por la metilcetona (Bernabéu-Roda 2014). Por lo tanto, ante esta nueva situación decidimos por un lado volver a hacer mutagénesis y escrutinio en las nuevas condiciones, y por otro, reevaluar el comportamiento en movilidad de los transposantes GRS en agar Noble 0.6%, lo que nos permitiría comprobar si estos mutantes estaban afectados en movilidad en superficie en ausencia de 2-TDC.

Salvo la utilización de MM suplementado con agar Noble al 1% en el escrutinio de transposantes derivados de GR4, el procedimiento experimental empleado en la selección de mutantes insensibles a 2-TDC fue el mismo que el utilizado en la selección de los mutantes GRS: escrutinio mediante ensayos en picadura de las colonias Km^r , y elección de candidatos que tras tres ensayos seguían teniendo un comportamiento en movilidad en respuesta a 2-TDC reducido respecto del de la cepa parental. De los 5244 transposantes GR4::Tn5 analizados en esta mutagénesis se seleccionaron ocho; la mayoría de ellos no mostraron respuesta a 2-TDC, mientras que otros mostraron una respuesta menor que la cepa parental. A estos transposantes se les identificó como GTI (de *GR4 2-Tridecanone Insensitive mutants*): GTI43, GTI49, GTI164, GTI302, GTI369, GTI878, GTI1138 y GTI1181.

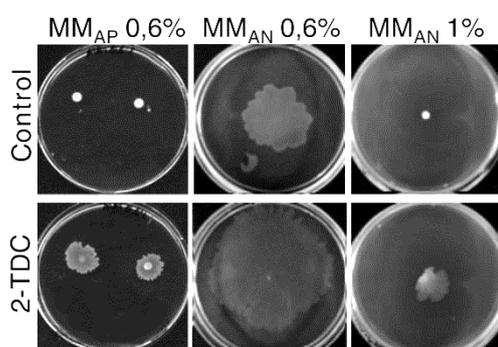


Figura 2.1: Movilidad en superficie de *S. meliloti* GR4 en distintas condiciones: Aspecto macroscópico de la colonia crecida en MM solidificado con agar Pronadisa (AP) o Noble (AN) en presencia o ausencia de 1 μ mol de 2-TDC. (Adaptada de Bernabéu-Roda, 2014).

Una vez seleccionados los transposantes insensibles o con una baja respuesta frente a 2-TDC, se hacía necesaria una evaluación en profundidad de este fenotipo de respuesta a la MK, así como también de otros fenotipos como movilidad *swarming* en

ausencia de 2-TDC y movilidad *swimming*. Como se ha indicado anteriormente, decidimos incluir junto con los transposantes GTI obtenidos en la mutagénesis con agar Noble a los GRS aislados previamente. Antes de comenzar con los experimentos para la caracterización fenotípica se realizó la caracterización genética, con el fin de determinar para cada transposante el gen afectado por la inserción del Tn5, información de la que ya se disponía en el caso de los mutantes GRS.

Los detalles de la caracterización genética y fenotípica para ambos grupos de transposantes se exponen a continuación, y los aspectos más relevantes de las mismas se recogen, a modo de resumen, en la Tabla 2.1.

2.2. Caracterización genética de los transposantes afectados en movilidad en respuesta a 2-TDC.

Mediante experimentos de hibridación del ADN genómico de cada uno de los transposantes GTI con una sonda específica para el transposón Tn5 pudimos comprobar el número de inserciones presentes en cada uno de ellos (ver Materiales y Métodos para más detalle), con el fin de descartar aquellos en los que el transposón se hubiese insertado más de una vez. Así, descartamos de los estudios posteriores al transposante GTI49, cuyo perfil de hibridación indicó que presentaba dos inserciones. Seguidamente a los experimentos de hibridación se procedió a identificar el sitio de inserción del Tn5 mediante PCR arbitraria (Miller-Williams *et al.* 2006) y posterior secuenciación, realizando la búsqueda con ayuda del software BLASTn (Altschul *et al.* 1990) y la base de datos del genoma de *S. meliloti* Rm1021 (Galibert *et al.* 2001).

El mismo procedimiento se había seguido previamente para los mutantes GRS.

2.2.1. Caracterización genética de los transposantes GRS

Los transposantes GRS1 y GRS4012 resultaron estar afectados en el gen homólogo a *smc02160*; concretamente, el Tn5 se había insertado en el codón para el aa₂₆₁ en el caso del primero, y en el del aa₂₄₂ en el segundo. La teórica proteína codificada por *smc02160* se halla anotada como una posible permeasa de 436 aa. Inmediatamente aguas arriba de *smc02160* se localiza el gen *tep1*, que codifica otra permeasa de la familia MFS (del inglés *Major Facilitator Superfamily*) implicada en resistencia al antibiótico cloranfenicol y también en nodulación (van Dillewijn *et al.* 2009). Aguas abajo de *smc02160* se localiza un gen que potencialmente codifica una

citidin-difosfato-diacilglicerol (CDP)-alcohol fosfatidiltransferasa y que junto a los productos de otros dos genes adyacentes podría estar implicado en la síntesis de fosfolípidos. No obstante, no es esperable que la expresión de estos genes se encuentre afectada en los transposantes GRS1 y GRS4012, ya que un análisis *in silico* de sitios de inicio de la transcripción sugiere que *smc02159* se transcribiría de forma independiente al gen *smc02160* (Schlüter *et al.* 2013). Para los ensayos de caracterización fenotípica se continuó trabajando con el transposante GRS4012.

También el transposante GRS2015 estaba afectado en una proteína implicada en transporte, en concreto un teórico transportador tipo MFS de 394 aa codificado por el gen homólogo a *smc01368*. En este mutante el transposón se situó interrumpiendo el codón para el aa₁₁₄. Flanqueando a *smc01368* encontramos, aguas arriba, a *smc01367* que codifica una proteína con función desconocida, y *rpmG* (*smc01369*) que se encuentra aguas abajo y codifica una proteína ribosomal. Por la disposición de estos tres genes en el cromosoma, es poco probable que el Tn5 genere efectos polares.

Curiosamente, hasta cinco de los doce transposantes seleccionados en esta mutagénesis estaban afectados en el mismo gen. Los transposantes GRS577, GRS1452, GRS1980, GRS2175 y GRS2238 tenían el Tn5 insertado en diversas partes del gen homólogo a *smc01044*, anotado como *ntrY*. Este gen codifica una probable histidina quinasa transmembrana de 753 aa que actuaría como sensor de un sistema regulador de dos componentes (TCS, del inglés *Two Component System*). NtrY sería la encargada de fosforilar a la proteína reguladora que estaría codificada por el gen *ntrX*, localizado aguas abajo de *ntrY*. Como veremos más adelante, en este caso el transposón estaba afectando también la expresión del gen *ntrX*, ya que ambos genes forman parte del mismo operón. Aguas arriba de *ntrY* encontramos otro TCS formado por los genes *ntrBC*. Los transposantes GRS2175 y GRS2238 presentan el Tn5 insertado en la misma localización afectando al aa₂₀₅ de NtrY. Por su parte, el transposante GRS1980 contiene el Tn5 en el codón que codifica el aa₄₉₇. Finalmente, en los mutantes GRS1452 y GRS577 el transposón interrumpe la secuencia de la proteína a nivel del aa₅₁₀. En los ensayos posteriores para la caracterización fenotípica se siguió trabajando con el transposante GRS577 principalmente, y en menor medida con GRS1980 y GRS2175.

El transposante GRS2007 tenía la inserción del transposón en el gen homólogo a *smc00190*, que codifica una proteína de membrana de gran tamaño (2089 aa), no

caracterizada y anotada como teórico quimiorreceptor MCP (del inglés *Methyl-accepting Chemotaxis Protein*). En este caso el Tn5 se encontraba interrumpiendo el aa₁₆₀₆. El análisis de las secuencias próximas a *smc00190* indica que el transposón está afectando únicamente la funcionalidad de este gen. El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica reveló que además de dos dominios transmembrana en la región N-terminal y un posible dominio MCP, esta gran proteína presenta hasta 6 dominios apolipoproteína y dominios de tipo SMC (del inglés *Structural Maintenance of Chromosomes*), que aparecen en proteínas que se unen a ADN y participan en la organización y segregación de cromosomas en la división de células eucariotas, aunque también se identifican en proteínas de bacterias. Esto sugiere que *smc00190* no es un quimiorreceptor típico como los nueve que contiene en su genoma *S. meliloti* (Meier *et al.* 2007), y que podría desempeñar una función en la célula aún por identificar pero con efectos en la movilidad.

En el transposante GRS3009, la inserción del Tn5 interrumpe la secuencia codificante del gen homólogo a *smc02659* (*relA*), que codifica la sintasa/hidrolasa de la alarmona guanosina tetrafosfato (ppGpp) de 741 aa (inserción presente en el codón del aa₁₉₄). A través del *turnover* de ppGpp, RelA media en la respuesta astringente, la cual se desencadena ante una deficiencia brusca en las fuentes de nitrógeno y carbono durante el crecimiento en *S. meliloti* (Krol & Becker 2011). Aguas arriba de *relA* encontramos *rpoZ* (*smc02408*), que codifica la subunidad omega de la ARN polimerasa. Aguas abajo se encuentran dos genes que codifican teóricas proteínas de función desconocida (*smc02658* y *smc02657*). No se descarta que el Tn5 pueda estar ejerciendo algún efecto polar en la transcripción de estos genes aguas abajo de *relA*, ya que parece que no se transcriben de forma independiente (Schlüter *et al.* 2013).

Finalmente, encontramos dos transposantes afectados en genes del megaplásmido homólogo a pSymA (pRmeGR4c).

En el mutante GRS1457 el Tn5 interrumpe la secuencia codificante del gen homólogo a *sma1398*, que codifica una proteína de 259 aa anotada como una deshidrogenasa/reductasa de alcoholes de cadena corta. Concretamente, la inserción se encuentra al principio del gen, dentro del codón que codifica el aa₁₂. *sma1398* presenta cierta homología con *fabG*, que codifica una β -ceto acil-ACP reductasa implicada en metabolismo lipídico (Yu *et al.* 2014). Teóricamente este gen forma parte de un operón, con lo que no se descarta que la inserción del transposón esté afectando a los genes localizados aguas abajo, *sma1397* y *sma1394*, y que codifican

dos teóricas proteínas de función desconocida. El primer componente de dicho operón sería *sma1400*, que codifica una teórica acil-CoA deshidrogenasa.

En el transposante GRS5662 el Tn5 está interrumpiendo el codón codificante de aa₃₃₂ del gen homólogo a *sma0137*, anotado como una posible proteína bifuncional diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa de 733 aa, con posible papel en el metabolismo del segundo mensajero diguanilato cíclico (di-GMPc). Este gen está flanqueado por genes que codifican proteínas de función desconocida pero no formarían operón con ellos.

2.2.2. Caracterización genética de los transposantes GTI

Dos de los siete transposantes GTI resultaron estar afectados en el gen homólogo a *smc01368*, el cual ya se había identificado como afectado en uno de los transposantes GRS (GRS2015). Se trata de los transposantes GTI878 y GTI1181, en los que el Tn5 se insertó entre los codones para los aminoácidos aa₂₆₇-aa₂₆₈ en el primero, y aa₂₉₆-aa₂₉₇ en el segundo. Para los estudios posteriores, decidimos continuar trabajando con el transposante GTI1181.

También se han aislado mutantes insensibles a 2-TDC afectados en genes del regulón flagelar.

Por un lado tenemos a GTI369, en el que el Tn5 se había insertado en el codón para el aa₅₀₉ del gen *flhA* (*smc03054*). Este gen codifica una proteína transmembrana de 695 aa que forma parte del sistema de secreción tipo III del flagelo. No podemos descartar que la inserción del Tn5 afecte también a la expresión de los genes *fliR*-*smc03056* que están aguas abajo de *flhA*, aunque se ha localizado un sitio de inicio de la transcripción en *fliR* (Schlüter *et al.* 2013).

Por su parte, en el transposante GTI1138 el gen afectado es *flgG* (*smc03030*), concretamente a nivel del aa₁₄₃. FlgG es una proteína de 262 aa que forma parte del cuerpo basal del flagelo, concretamente del cilindro. Es muy probable que la inserción del Tn5 afecte como mínimo a la transcripción de *flgA*-*flgI*-*motE*-*flgH*-*fliL*.

En el mutante GTI43 el transposón se insertó en el gen homólogo a *smc02081*, en el codón para el aa₆₄. Dicho gen codifica una teórica proteína de 251 aa de función desconocida. Se encuentra flanqueado aguas arriba por *tolC* (codifica el componente de membrana externa de bombas de eflujo) y aguas abajo por *valS* (valina-ARNt ligasa), siendo poco probable que el Tn5 afecte la expresión de alguno de ellos. El análisis BLAST de la secuencia aminoacídica de esta teórica proteína de función

desconocida indica que se trata de una proteína conservada en especies de los géneros *Sinorhizobium/Ensifer*, *Rhizobium* y *Agrobacterium*. Muestra un dominio PopZ (del inglés *Pole-Organizing Protein*) que abarcaría prácticamente toda la cadena peptídica (del aa₁₂ al aa₂₅₁), y sus extremos N y C-terminal presentan cierto grado de identidad con la proteína PopZ de *A. tumefaciens* (Grangeon *et al.* 2015). PopZ es un factor que organiza la polarización de proteínas que participan en diversos aspectos de la vida bacteriana entre los que se encuentran la quimiotaxis, transducción de señales, morfogénesis o patogénesis (Grangeon *et al.* 2015; Sanselicio *et al.* 2015; Laloux & Jacobs-Wagner 2014). Además la proteína codificada por *smc02081* muestra un dominio no caracterizado perteneciente a la superfamilia DUF2497 (del inglés *Domain of Unknown Function*) localizado en el extremo C terminal (del aa₁₈₂ al aa₂₄₈).

En el transposante GTI164 el Tn5 interrumpió el codón que codifica el aa₂₂₃ del gen *smc03141*, que aparece anotado como una diguanilato fosfodiesterasa de 349 aa. En este caso también se descarta la generación de posibles efectos polares, ya que los genes adyacentes a *smc03141*, un gen con función desconocida (*smc03142*) y un posible regulador transcripcional (*smc03140*), se transcriben de forma independiente. En un estudio reciente se menciona que en la cepa Rm2011 (muy similar a Rm1021) de *S. meliloti* *smc03141* y *smc03142* codifican los extremos N- y C-terminal de una teórica proteína bifuncional (diguánilato ciclasa/fosfodiesterasa), que se ha truncado a consecuencia de una mutación en el codón 196 que lo convierte en un codón de terminación (Schäper *et al.* 2015). Curiosamente, en la cepa GR4 no existe tal mutación, de manera que *smc03141* y *smc03142* conforman una única secuencia codificante.

Por último, la secuencia interrumpida en el transposante GTI302 fue la del gen homólogo a *smc04454*, que codifica una proteína de 549 aa anotada como un teórico transportador de la familia ABC (del inglés, *ATP-Binding Cassette*). La inserción del Tn5 en este transposante afectó a la región final de la proteína, concretamente, al codón que codifica el aa₅₂₂. El análisis de la secuencia peptídica muestra que Smc04454 codifica el componente de unión a nucleótido de una bomba ABC que pertenecería a la familia ChvD. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener duplicado el dominio ATPasa y por no encontrarse codificados dentro de la estructura génica típica para este tipo de transportadores; esto es, no están codificados formando operón con el resto de componentes de la bomba (permeasa y proteína de unión a sustrato). En *S. meliloti* podemos encontrar una teórica ribonucleasa (*smc02819*) aguas arriba de *smc04454* y un regulador transcripcional aguas abajo del mismo

(*smc01842*); ninguno de los dos estaría afectado por la inserción del Tn5. El transportador ChvD controla la expresión del gen *virG* en *Agrobacterium tumefaciens* y está implicado en la virulencia de este patógeno vegetal. Además, un mutante en *chvD* en esta bacteria muestra retrasos en crecimiento en medio rico pero no en medio mínimo (Liu *et al.* 2011).

En resumen, la caracterización genética de los 19 transposantes derivados de *S. meliloti* GR4 seleccionados por tener una movilidad en superficie reducida en presencia de 2-TDC (12 GRS y 7 GTI), ha permitido identificar 12 genes diferentes que podrían estar implicados en el mecanismo de acción de la metilcetona. Si hacemos una clasificación a nivel funcional encontramos: genes que podrían estar implicados en transporte (*smc01368*, *smc02160* y *smc04454*), genes flagelares (*flhA* y *flgG*), genes implicados en metabolismo central (*ntrY*, *sma1398*), genes implicados en el metabolismo de segundos mensajeros como di-GMPc (*smc03141* y *sma0137*), o ppGpp (*relA*) y genes con función aún por determinar (*smc00190* y *smc02081*).

2.3. Caracterización fenotípica de los transposantes afectados en movilidad en respuesta a 2-TDC.

Una vez hecha la identificación genética de los transposantes se procedió a caracterizar el fenotipo de aquellos seleccionados como representantes para cada mutación. Para ello, comenzamos por evaluar su comportamiento en motilidad en superficie mediante ensayos finos siguiendo el protocolo estándar, esto es, creciendo las cepas desde glicerol y no en picadura y sembrándolas en placas individualmente (ver Materiales y Métodos).

Como se ha mencionado al inicio de este capítulo, la identificación del agar Noble como un agente gelificante más permisivo para estudiar la motilidad en superficie en *S. meliloti*, nos llevó a emplearlo de forma rutinaria en el laboratorio en sustitución del agar Pronadisa. Por lo tanto, los ensayos finos de movilidad en superficie para evaluar la respuesta a 2-TDC de los transposantes, tanto los GTI como los GRS, se realizaron con agar Noble. Además, gracias a estas nuevas condiciones experimentales, era posible comparar la movilidad en superficie de estos mutantes con la de GR4 en ausencia de la MK inductora, lo que permitiría comprobar si el defecto mostrado por los transposantes era consecuencia exclusiva de su insensibilidad a 2-TDC, a un defecto en movilidad en superficie, o a ambos.

También se incluyeron en estos estudios tanto el transposante control GR4C para comprobar que la inserción del Tn5 por sí sola no generaba ningún efecto sobre la movilidad, como el derivado aflagelado GR4 Δ flaAB, que al carecer de flagelos no se mueve en condiciones inductoras de *swarming* pero sí responde de forma notable a 2-TDC (Bernabéu-Roda 2014). Como se ha mencionado, de los transposantes que estaban afectados en un mismo gen se evaluó sólo uno como representativo. Así, se escogió a GRS577 de los afectados en *ntrY*, GRS4012 para los afectados en *smc02160*, y GTI1181 para los afectados en *smc01368*.

Además, para todos los transposantes se evaluó el crecimiento en medio rico (TY) y MM, así como la movilidad *swimming* con el objetivo de discernir entre aquellos determinantes genéticos que controlan movilidad en general de los implicados exclusivamente en desplazamiento en superficie.

2.3.1. Evaluación de la movilidad en superficie, respuesta a 2-Tridecanona y movilidad *swimming* en los transposantes GRS

Como ya se ha comentado, estos mutantes se seleccionaron en MM_{AP} (0,6%). Para los ensayos posteriores en MM_{AN} (0,6%), decidimos descartar de entrada al mutante GRS5662 (*sma0137::Tn5*, teóricamente afectado en una proteína bifuncional diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa), debido a que mostraba un crecimiento en MM seriamente retrasado en comparación a la cepa silvestre (datos no mostrados).

En primer lugar hay que indicar que debido a la gran variabilidad que tienen los experimentos de movilidad en superficie con *S. meliloti* se hace necesario incluir siempre una cepa de referencia para poder establecer comparativas fiables. Por ello, cada vez que se hacía un ensayo, ya fuese con los transposantes GRS o el control GR4C, o con el mutante GR4 Δ flaAB, en paralelo se ensayaba la cepa silvestre GR4. Esto explica los diferentes grados de movilidad de GR4 reflejados en los distintos gráficos de la Figura 2.2.

Se pudo comprobar que en ausencia de la MK, la mayoría de los transposantes GRS se encontraban bastante afectados en movilidad en superficie (MM, barras negras). Únicamente el transposante GRS2015 (afectado en un teórico transportador MFS, al igual que los mutantes GTI878 y GTI1181) mostró una capacidad de desplazamiento que, si bien menor, era bastante similar a la de la cepa parental GR4. De los distintos transposantes GRS, sólo el mutante afectado en *relA* (GRS3009)

mostró un ligero retraso en el crecimiento en MM líquido con respecto a GR4 (datos no mostrados), que podría explicar parcialmente su menor capacidad para desplazarse en superficie.

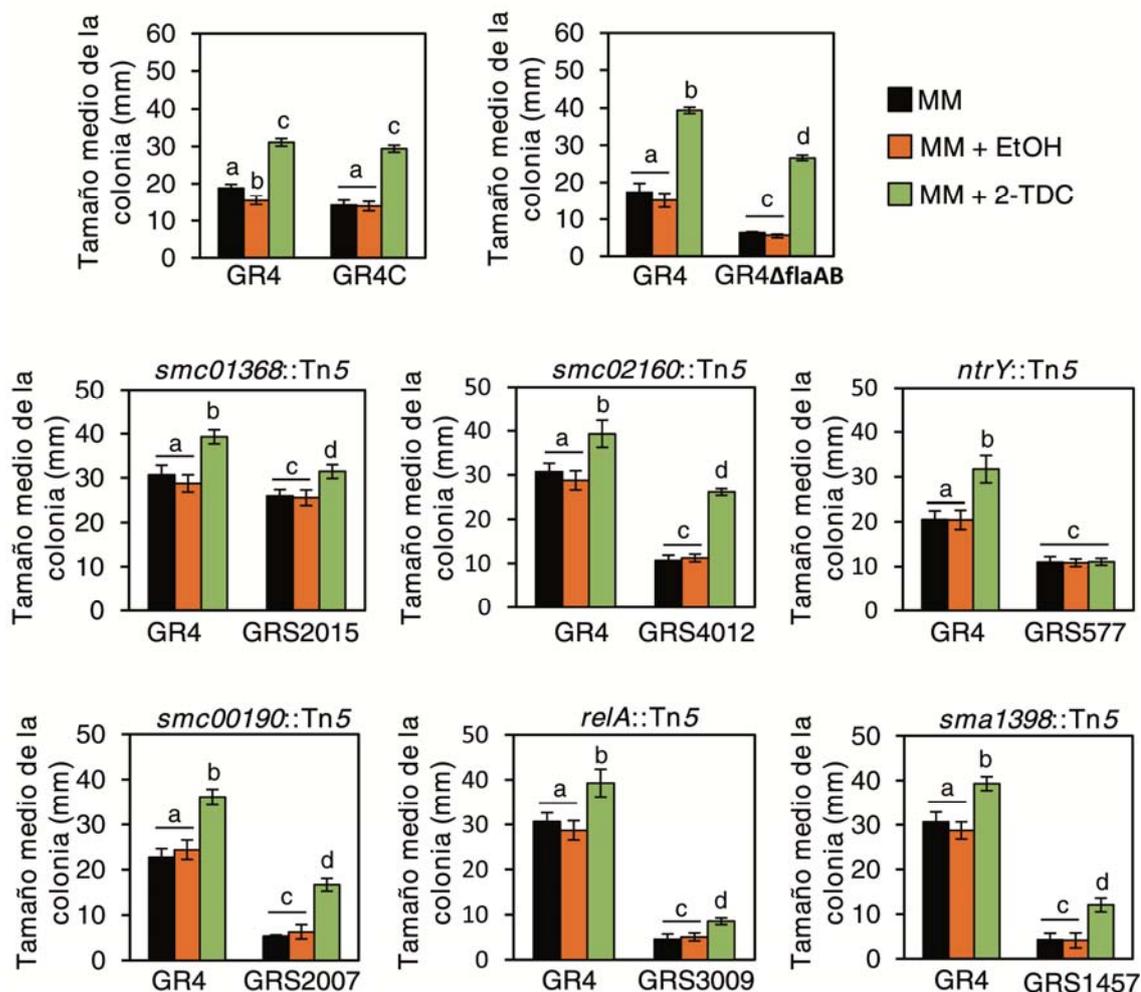


Figura 2.2: Ensayos de movilidad en superficie de los transposantes GRS derivados de *S. meliloti* GR4 en MM_{AN} (0,6% agar). Las barras indican el grado medio de expansión (en mm) alcanzado por las distintas cepas tras 24 horas de incubación en condiciones sin tratamiento (barras negras), o en presencia de 1 μ mol de 2-TDC aplicada como volátil (barras verdes) o etanol como control (barras naranja). Las barras de error representan el error estándar de la media calculado a partir de un mínimo de doce medidas en dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$) se indican con distintas letras.

En cuanto a la respuesta a 2-TDC (barras verdes) con respecto al control con etanol (barras naranja), en las nuevas condiciones experimentales casi todos los transposantes respondieron incrementando su movilidad en presencia de la MK. En términos absolutos ninguno alcanzó el grado de expansión de GR4, y en concreto para los transposantes GRS2007, GRS3009 y GRS1457 el halo alcanzado fue inferior incluso al del GR4 Δ flaAB. En el caso particular del transposante GRS2015 la

respuesta a 2-TDC no fue muy pronunciada en comparación a la movilidad que mostró en la situación control. Finalmente, el único transposante que no incrementó su grado de expansión en presencia de 2-TDC y se siguió comportando como se había observado en la selección con agar Pronadisa fue GRS577 (*ntrY::Tn5*).

En cuanto al fenotipo *swimming*, ninguno de los transposante GRS analizados fueron completamente defectivos como la cepa GR4 Δ *flaAB* (Figura 2.3). GRS577 y GRS2007 sí estaban bastante afectados con respecto a GR4, pero exhibieron mayor capacidad de desplazarse en BM (0,3% de agar) que su derivado aflagelado. Por lo tanto estos mutantes están alterados en movilidad en general, por eso presentan menor capacidad de desplazarse en superficie. También el mutante en *relA* mostraba un ligero retraso con respecto a GR4, aunque eran diferencias poco pronunciadas. Finalmente, los transposantes GRS4012 y GRS1457, que tienen menor capacidad de desplazamiento en superficie, no mostraron diferencias con respecto a GR4 en movilidad *swimming*, con lo que los genes afectados en estas cepas sí parecen estar implicados exclusivamente en movilidad en superficie. Aunque el fenotipo *swimming* del transposante GRS2015 afectado en el gen *smc01368* no se ha evaluado en estos ensayos, presuponemos que no será muy distinto del mostrado por GT1181, ya que ambos tienen afectado el mismo gen.

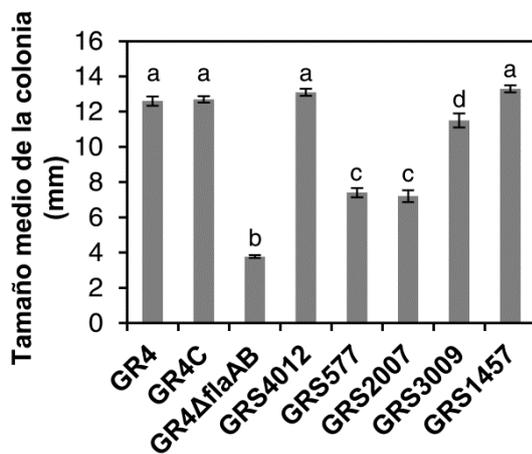


Figura 2.3: Movilidad *swimming* de los transposantes GRS derivados de *S. meliloti* GR4. El gráfico indica el halo medio (en mm) alcanzado por cada cepa crecida en medio BM (0,3% de agar) tras 48 horas de incubación. Las barras representan el error estándar de la media, calculado a partir de un mínimo de doce medidas en dos experimentos independientes. Las diferencias significativas (análisis ANOVA, $P \leq 0,05$) se indican con distintas letras.

Por lo tanto, la reevaluación de la movilidad en respuesta a 2-TDC en MM_{AN} de los transposantes GRS aislados en los ensayos con agar Pronadisa indica que todos ellos se encuentran afectados en su capacidad de desplazarse en superficie. Sólo en dos de ellos, los genes afectados parecen ser específicos de la movilidad en superficie y codifican una teórica permeasa y una reductasa de alcoholes. Además, con estas condiciones más permisivas la mayoría sí responden algo a la presencia de la MK

incrementando su desplazamiento en superficie, si bien el halo alcanzado en algunos de ellos es bastante inferior al que muestra la cepa parental. El transposante GRS577 fue el único que no respondió a la 2-TDC, aunque el fenotipo mostrado por GRS2015 y GRS3009 también es interesante, ya que su nivel de respuesta a la MK no es muy alto.

2.3.2. Evaluación de la movilidad en superficie, respuesta a 2-Tridecanona y movilidad *swimming* en los transposantes GTI

Ninguno de los mutantes GTI se encontraba afectado en crecimiento en MM líquido. Sin embargo, tanto GTI43 como GTI302 exhibieron un ligero retraso en el crecimiento en medio rico TY con respecto a la cepa parental (datos no mostrados).

Los análisis individualizados del comportamiento en superficie de cada uno de los transposantes en las mismas condiciones que se utilizaron para su aislamiento (MM_{AN} conteniendo 1% de agar), revelaron que algunos de ellos no eran totalmente insensibles y respondían algo a la presencia de 2-TDC, incrementando su desplazamiento en superficie (Tabla 2.1 y Figura 2.4). Éste es el caso del transposante GTI1181 (afectado en el transportador MFS) y los dos mutantes afectados en genes flagelares (*flhA* y *flgG*), si bien en los tres el grado de expansión de la colonia era inferior al de GR4 y al del mutante aflagelado GR4 Δ flaAB. Como vemos en la Figura 2.4, GR4 Δ flaAB se comporta frente a 2-TDC igual que la cepa silvestre. El resto de los transposantes analizados (GTI43, GTI164 y GTI302) siguieron mostrando el mismo fenotipo que en el escrutinio, y no incrementaron su expansión en presencia de 2-TDC. Acorde con el porcentaje de agar utilizado, ninguna de las cepas mostró movilidad en ausencia de la MK (barras blancas y moradas).

En cuanto al comportamiento mostrado por los distintos mutantes en MM_{AN} (0,6% agar) en ausencia de 2-TDC, el transposante que mostró mayor desplazamiento fue GTI1181, con niveles parecidos a GR4 aunque ligeramente menores. Como era de suponer, si se compara la movilidad en superficie y la respuesta a 2-TDC de este mutante con GRS2015 (afectados en el mismo gen), vemos que los dos se comportan de forma parecida en condiciones inductoras de *swarming* y los dos incrementan su halo de expansión en presencia de la MK. Además de los mutantes afectados en genes flagelares GTI369 y GTI1138, los demás transposantes también mostraron menor habilidad para desplazarse que GR4, lo cual indica que la inserción del Tn5

afecta a componentes requeridos en la movilidad en superficie de esta cepa (Figura 2.5, barras negras).

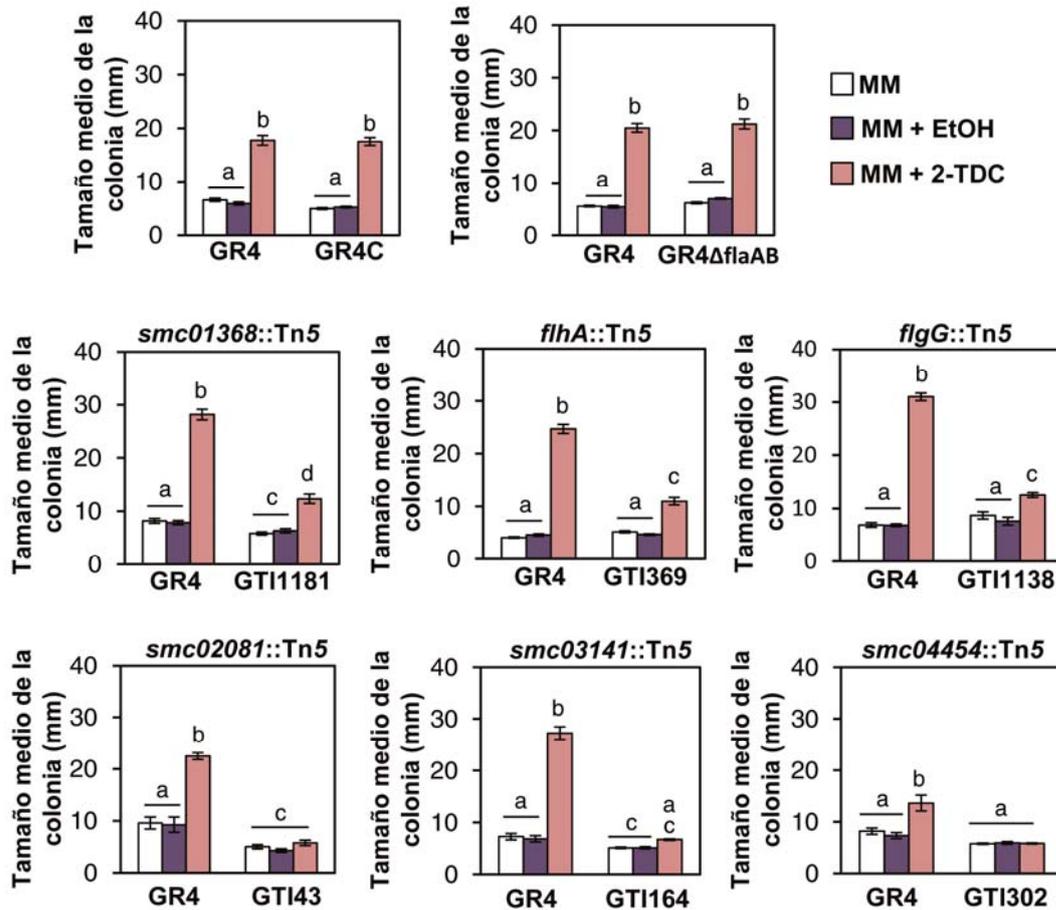


Figura 2.4: Ensayos de movilidad en superficie de los transposantes GTI derivados de *S. meliloti* GR4 en MM_{AN} (1% agar). Las barras indican el grado medio de expansión (en mm) alcanzado por las distintas cepas tras 24 horas de incubación en condiciones sin tratamiento (barras blancas), o en presencia de 1 μmol de 2-TDC aplicada como volátil (barras rosas) o etanol como control (barras moradas). Las barras de error representan el error estándar de la media calculado a partir de un mínimo de doce medidas en dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a un análisis ANOVA (P≤0,05) se indican con letras distintas.

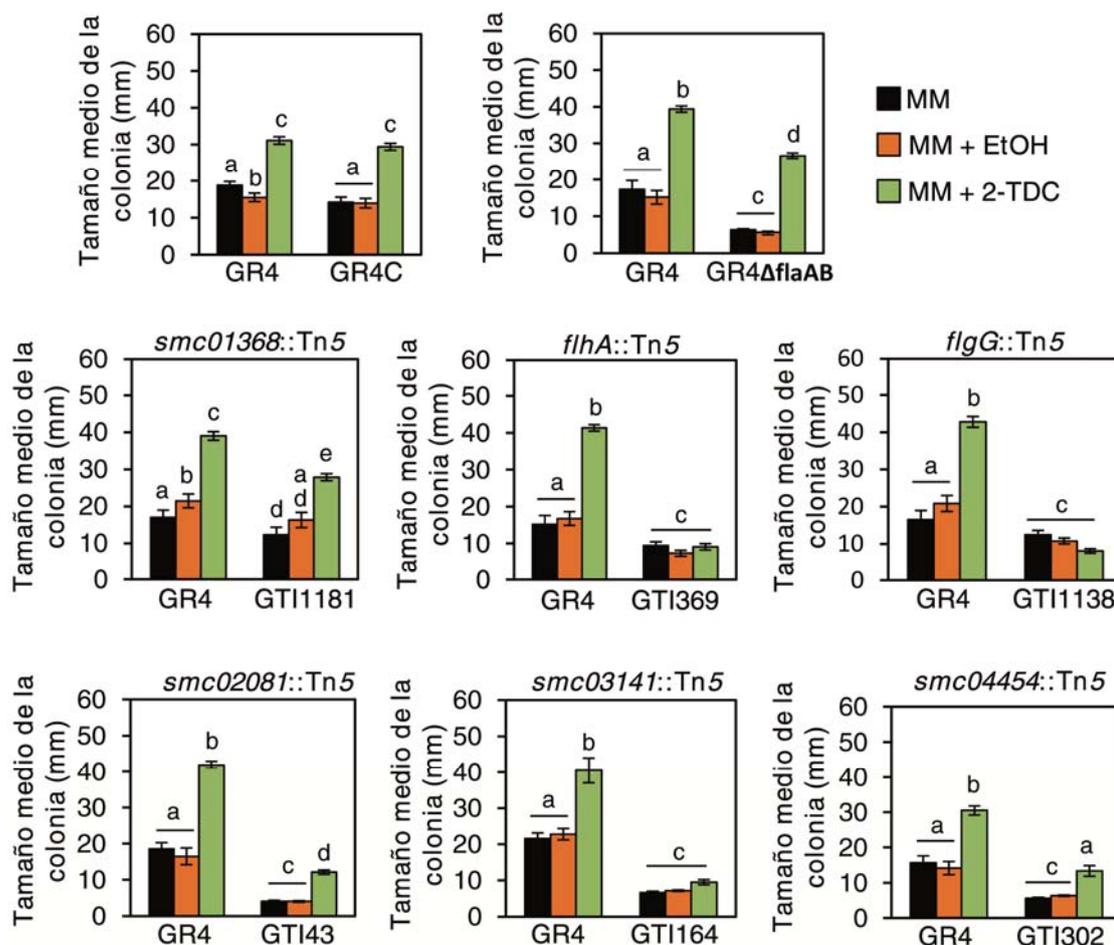


Figura 2.5: Ensayos de movilidad en superficie de los transposantes GTI derivados de *S. meliloti* GR4 en MM_{AN} (0,6% agar). Las barras indican el grado medio de expansión (en mm) alcanzado por las distintas cepas tras 24 horas de incubación en condiciones sin tratamiento (barras negras), o en presencia de 1 μ mol de 2-TDC aplicada como volátil (barras verdes) o etanol como control (barras naranja). Las barras de error representan el error estándar de la media calculado a partir de un mínimo de doce medidas en dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$) se indican con letras distintas.

Algunos de los mutantes que no eran capaces de moverse en presencia de 2-TDC creciendo en agar al 1% (comparar barras moradas y rosas en Figura 2.4), sí respondieron en esta ocasión ante condiciones más permisivas (comparar barras naranja y verde en Figura 2.5). Es el caso de las cepas GTI43 y GTI302, aunque el halo de expansión para ambas era muy inferior comparado tanto con GR4 como con su derivado aflagelado. Sin embargo es muy llamativo que los dos transposantes afectados en genes flagelares que en 1% respondían, en estas condiciones ya no lo hacían. Por su parte, el transposante GTI1181 siguió respondiendo a la MK también en menor grado en comparación a GR4, pero esta vez con un grado de expansión similar al mostrado por GR4flaAB. Finalmente el único de los transposantes GTI que

siguió sin responder a la 2-TDC fue GTI164, afectado en un gen implicado en metabolismo del di-GMPc.

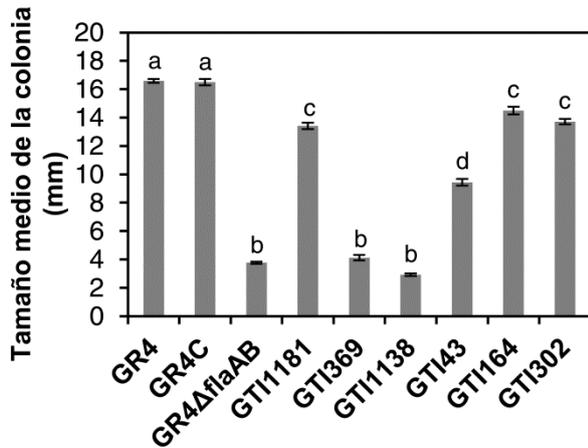


Figura 2.6: Movilidad *swimming* de los transposantes GTI derivados de *S. meliloti* GR4. El gráfico indica el halo medio (en mm) alcanzado por cada cepa en medio BM (0,3% de agar) tras 72 horas de incubación. Las barras de error representan el error estándar de la media, calculado a partir de un mínimo de doce medidas en dos experimentos independientes. Las diferencias significativas (análisis ANOVA, $P \leq 0,05$) se indican con distintas letras.

Por último, para determinar cuáles de entre estos genes podrían participar de forma específica en el control de la movilidad en superficie, se realizaron ensayos de movilidad *swimming*, también comparando los distintos transposantes con la cepa parental GR4 y las cepas control GR4C y GR4flaAB (Figura 2.6).

Los transposantes GTI369 y GTI1138 afectados en genes flagelares no exhibieron movilidad *swimming*, como se presuponía de cepas que deben carecer de flagelos. El resto sí mostraron movilidad; las cepas GTI1181, GTI164 y GTI302, presentaron una movilidad ligeramente inferior a la de la cepa parental, mientras que GTI43 tenía una reducción considerable del halo *swimming* en comparación a GR4.

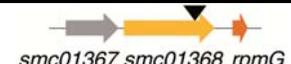
Por lo tanto, podemos decir que salvo los transposantes afectados en genes del flagelo el resto no tienen anulada completamente la movilidad *swimming*, aunque sí está ligeramente reducida con respecto a la cepa parental. Por el contrario, la mayoría de los transposantes presentaron un retraso significativo a la hora de desplazarse en superficie respecto a la cepa parental. Además, excepto los mutantes afectados en un teórico transportador MFS que sólo mostraron una reducción en la respuesta a 2-TDC, los otros 5 transposantes resultaron ser insensibles a la presencia de la MK en alguna de las dos condiciones experimentales ensayadas, siendo sólo 1 de ellos (GTI164) insensible en las dos condiciones.

A modo de resumen, la evaluación de la movilidad llevada a cabo en los doce transposantes seleccionados por ser insensibles a 2-TDC, ha desvelado que todos ellos son defectivos en mayor o menor grado en translocación en superficie en

ausencia de la MK. Entre los genes identificados como afectados en los distintos mutantes, 5 de ellos (*smc03141* que codifica una teórica diguanilato fosfodiesterasa, *smc02160* que codifica una teórica permeasa, *relA*, *sma1398* que codifica una teórica deshidrogenasa/reductasa de alcoholes de cadena corta y *smc04454* que codifica un transportador ABC) desempeñan una función relevante en el desplazamiento en superficie, y en concreto los genes *smc02160* y *sma1398*, parecen ser determinantes exclusivos de este tipo de movilidad, ya que los correspondientes transposantes mostraron una movilidad *swimming* idéntica a la exhibida por la cepa parental. Por su parte, los genes *flhA*, *flgG*, *smc02081*, *ntrY*, y *smc00190* controlan aspectos generales de la movilidad bacteriana, ya que tanto el desplazamiento en superficie como la movilidad *swimming* se vieron severamente afectados. Los mutantes que mostraron menor alteración en la movilidad en superficie y en respuesta a 2-TDC fueron los afectados en *smc01368*. Finalmente, aunque todos los mutantes resultaron estar afectados en alguna medida en su respuesta a la aplicación de 2-TDC volátil (obvio ya que fue el criterio utilizado en su selección), sólo dos mutantes resultaron ser completamente insensibles a la MK: GT1164 y GRS577. El primero que es incapaz de desplazarse en superficie pero muestra una movilidad *swimming* muy parecida a la cepa parental se encuentra afectado en una teórica proteína con función en el metabolismo del segundo mensajero di-GMPc. El segundo, con defectos en movilidad general, está afectado en el componente sensor del TCS NtrY/NtrX, implicado en el metabolismo del nitrógeno en diversas bacterias, pero que en el momento de la identificación del transposante, nunca se había relacionado con control del movimiento bacteriano. Por este motivo, decidimos caracterizar en profundidad la cepa GRS577, estudiando qué fenotipos presentaba este transposante tanto en vida libre como durante el establecimiento de simbiosis con alfalfa. En la sección 2.4 de este capítulo se recogen los resultados obtenidos en dicha caracterización.

Tabla 2.1: Resumen del genotipo y fenotipos relacionados con movilidad de transposantes GRS y GTI derivados de GR4.

Cepas control							
Cepa	Genotipo			Movilidad <i>swimming</i>	Movilidad en superficie		
					- 2-TDC MM _{AN} (0,6%)	+ 2-TDC	
						MM _{AN} (0,6%)	MM _{AN} (1%)
GR4	Cepa silvestre			+++	+++	+++	+++
GR4Δ <i>flaAB</i>	<i>flaAflaB</i> ::Hygr			-	-	++	+++
Transposantes							
Cepa	Gen afectado	Función de la proteína	Punto de inserción del Tn5 (▼)	Movilidad <i>swimming</i>	Movilidad en superficie		
					- 2-TDC MM _{AN} (0,6%)	+ 2-TDC	
						MM _{AN} (0,6%)	MM _{AN} (1%)
GR4C	nd ^a	nd	nd	+++	+++	+++	+++
GRS4012 GRS1	<i>smc02160</i>	Teórica permeasa		+++	-	++	ne ^b
GRS2015	<i>smc01368</i>	Teórico transportador MFS		++	++	++	ne
GRS577 GRS1452 GRS1980 GRS2175 GRS2238	<i>ntrY</i> (<i>smc01044</i>)	Histidina quinasa sensora de un TCS implicado en metabolismo del nitrógeno		+	+	-	ne
GRS2007	<i>smc00190</i>	Proteína de membrana de función no caracterizada. Anotada como MCP.		+	-	+	ne
GRS3009	<i>relA</i> (<i>smc02659</i>)	Sintasa/hidrolasa de la alarmona ppGpp		++	-	+	ne

GRS1457	<i>sma1398</i>	Teórica deshidrogenasa/reductasa de alcoholes de cadena corta		+++	+	+	ne
GRS5662^c	<i>sma0137</i>	Teórica diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa		ne	ne	ne	ne
GTI1181 GTI878	<i>smc01368</i>	Teórico transportador MFS		++	++	++	++
GTI369	<i>flhA</i> (<i>smc03054</i>)	Componente del sistema de secreción tipo III de la maquinaria flagelar		-	-	-	+
GTI1138	<i>flgG</i> (<i>smc03030</i>)	Proteína del eje del cuerpo basal del flagelo		-	-	-	+
GTI43	<i>smc02081</i>	Función desconocida		+	-	+	-
GTI164	<i>smc03141</i>	Diguanilato fosfodiesterasa		++	-	-	-
GTI302	<i>smc04454</i>	Teórico transportador ABC		++	-	+	-

En la tabla se enumeran todos los transposantes seleccionados pero se recogen los datos para los transposantes representantes de cada mutación (señalados en negrita). Como referencia para determinar el grado de movilidad alcanzado en las distintas condiciones se ha tomado el comportamiento de las cepas GR4 y GR4flaAB (*flaA flaB*), y las comparaciones se han hecho teniendo en cuenta el halo de expansión alcanzado en términos absolutos.

^a nd = no determinado

^b ne = no evaluado

^c Se descartó este transposante de la caracterización fenotípica por problemas de crecimiento.

2.4. Caracterización fenotípica del transposante GRS577. Papel del sistema regulador de dos componentes NtrY/NtrX en el control de fenotipos en vida libre y en simbiosis de *S. meliloti* GR4.

Como se ha indicado en el Apartado 2.2.1, hasta en cinco transposantes de *S. meliloti* GR4, seleccionados por ser insensibles a 2-TDC, el Tn5 se encontraba interrumpiendo la secuencia codificante del gen *ntrY* en tres posiciones distintas, representadas por los transposantes GRS577, GRS1980 y GRS2175 (Figura A2.1 de Anexo 2.1). Todos ellos mostraban una movilidad *swarming* reducida con respecto a GR4 (Figura 2.7). Esto, junto con la menor movilidad *swimming* mostrada por GRS577 (Figura 2.3), sugería la participación de *ntrY* en el control de la movilidad general en *S. meliloti*. Para evaluar este papel de *ntrY*, gen que no aparecía en la bibliografía relacionado con movilidad bacteriana, decidimos abordar una caracterización más profunda empleando para ello el transposante GRS577.

El gen *ntrY* codifica el componente sensor del sistema regulador de dos componentes NtrY/NtrX. Este sistema se ha estudiado y caracterizado en diversos géneros bacterianos, en los que se ha relacionado principalmente con la regulación del metabolismo del nitrógeno. En *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, *Rhodobacter capsulatus*, *Ehrlichia chaffeensis*, y *Herbaspirillum seropedicae*, NtrY/NtrX es requerido para la asimilación de diferentes fuentes de nitrógeno, tales como nitrato o amonio (Bonato *et al.* 2016; Cheng *et al.* 2014; Drepper *et al.* 2006; Ishida *et al.* 2002; Nogales *et al.* 2002; Pawlowski *et al.* 1991). En *A. caulinodans* y *R. capsulatus*, el sistema se requiere además para la fijación de nitrógeno. En *Brucella* spp. NtrY/NtrX actúa como un sensor redox que influye en la capacidad de replicación de la bacteria en el interior de células eucariotas. En estas bacterias patógenas, se ha demostrado que el sistema NtrY/NtrX regula la expresión de enzimas respiratorias tales como enzimas que participan en la respiración del nitrógeno (desnitrificación) y citocromo oxidasa de alta afinidad (Carrica *et al.* 2013; 2012). Esta función reguladora también se ha asignado al sistema NtrY/NtrX de otro patógeno de mamíferos, *Neisseria gonorrhoeae* (Atack *et al.* 2013). Por otro lado, en la bacteria fotosintética *R. capsulatus* se ha implicado a este sistema regulador con la formación de los complejos fotosintéticos (Gregor *et al.* 2007).

Durante el proceso de caracterización fenotípica de GRS577 se publicó un estudio realizado con la cepa de *S. meliloti* Rm1021 en el que se implicaba al regulador de respuesta NtrX, pero no al sensor NtrY, con la regulación de la movilidad, la producción del exopolisacárido succinoglucano (EPS I) y la fijación simbiótica de

nitrógeno (Wang *et al.* 2013). En este trabajo, Wang y colaboradores trataban de caracterizar la función de los genes *ntrY/ntrX* en *S. meliloti* mediante la construcción de mutantes por delección en ambos genes. Sin embargo, debido a la esencialidad de *ntrX* no consiguieron obtener el mutante por delección, con lo que alternativamente optaron por la construcción de un mutante por co-integración empleando la misma construcción plasmídica diseñada para la delección de *ntrX*. Dicho mutante por inserción en *ntrX* presentaba una movilidad *swimming* reducida, una mayor producción de EPS I y defectos en fijación de nitrógeno en simbiosis. Sorprendentemente, la delección del sensor *ntrY* no resultó ser esencial, y además el mutante correspondiente no mostró ninguno de estos fenotipos, comportándose como la cepa silvestre.

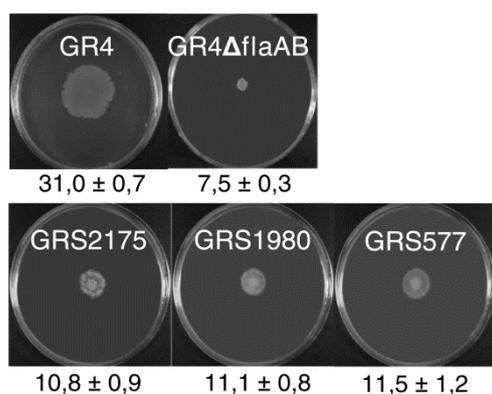


Figura 2.7: Desplazamiento en superficie de los mutantes derivados de GR4 afectados en el gen *ntrY*. Movilidad que muestran la cepa silvestre GR4, su derivado aflagelado GR4flaAB, y los transposantes *ntrY::Tn5* en MM_{AN} semisólido (0,6%) tras 24 horas de incubación. Debajo de cada imagen se indican el valor medio de expansión de la colonia y el error estándar (en mm) calculados a partir de al menos doce medidas en tres experimentos independientes.

Fijándonos en los fenotipos en vida libre, el transposante derivado de GR4 y afectado en *ntrY* GRS577, presentaba similitudes con respecto al mutante en *ntrX* de Rm1021 descrito por Wang y colaboradores. Así, además del defecto en movilidad en superficie, también estaba afectado en la movilidad tipo *swimming* (Figuras 2.8a). Ambos fenotipos tenían su explicación en el hecho de que el transposante GRS577 producía un menor número de flagelos en comparación a la cepa parental (Figura 2.8b, Tabla 2.2). Adicionalmente, la morfología que mostraba GRS577 difería de la mostrada por la cepa silvestre, siendo las células del transposante más pequeñas, con una forma más esférica y además tendían a formar agregados (Figura 2.8b, Tabla 2.2). Estos rasgos morfológicos sugerían que el mutante podría mostrar defectos a nivel de envuelta celular, como así reveló un análisis de sensibilidad al detergente SDS. Mediante la realización de un bioensayo empleando discos impregnados de este detergente a una concentración del 10%, pudimos ver que aparecía un halo de inhibición del crecimiento significativamente mayor en el transposante (Figura 2.8c). Otro fenotipo compartido con el mutante por inserción en *ntrX* derivado de Rm1021 es la apariencia mucosa que muestra GRS577, rasgo que se pone de manifiesto cuando

la bacteria crece en medio definido (MM) y no en medio rico (TY), lo cual sugiere una dependencia del estado nutricional de las células (Figura 2.8d). La emisión de fluorescencia tras iluminar con luz ultravioleta de las células crecidas en placas de MM suplementado con el colorante calcoflúor, el cual se utiliza para la tinción de polisacáridos (Herth & Schnepf 1980), sugería una súper-producción de EPS I (Figura 2.8d). Esto se confirmó cuando tanto el aspecto mucoso como la fluorescencia asociados a la mutación *ntrY::Tn5* desaparecieron al inactivar el gen *exoY* (clave en la biosíntesis de este exopolisacárido) en la cepa GR4YntrY (Figura 2.8e) (ver Figura A2.1 de Anexo 2.1 para más detalle).

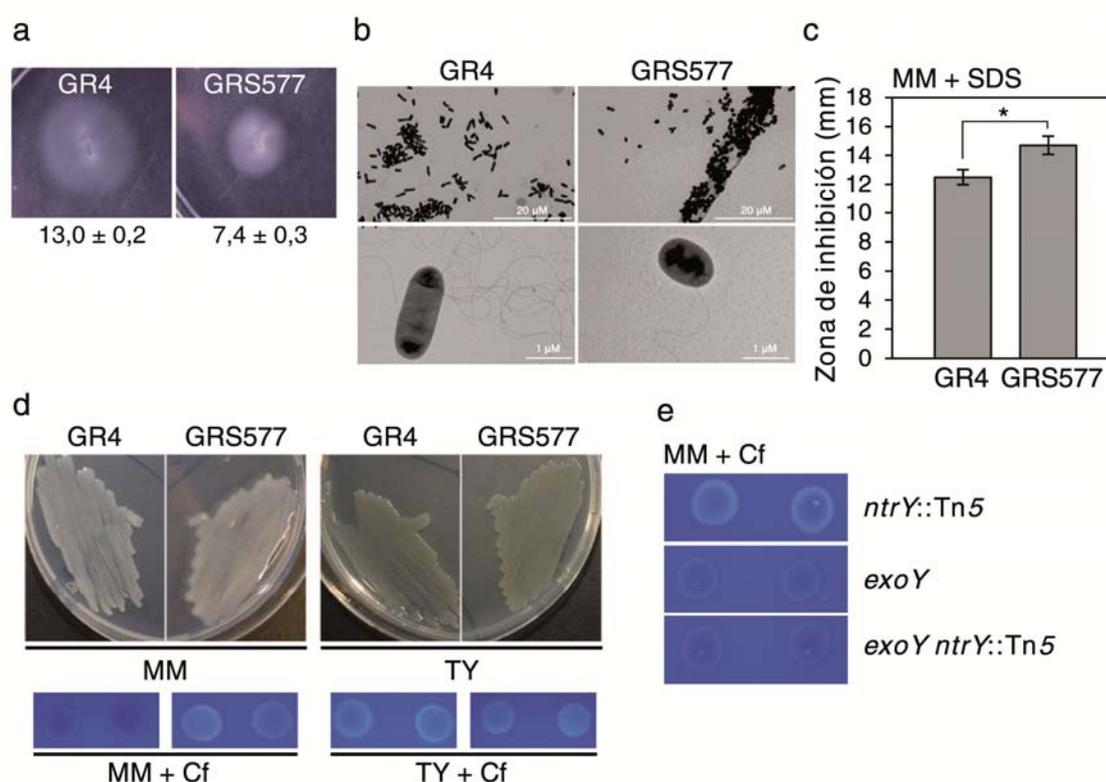


Figura 2.8: (a) Ensayo de movilidad *swimming* de la cepa silvestre GR4 y su derivado *ntrY::Tn5* GRS577. Las imágenes se tomaron tras 72 horas de incubación a 30 °C. El halo de expansión medio (en mm) y su error estándar, calculados a partir de al menos doce medidas en tres experimentos independientes, se indican debajo de cada fotografía. (b) Imágenes al microscopio electrónico de transmisión (TEM) mostrando la morfología y los flagelos producidos por las células de la cepa parental y del mutante crecidas en MM_{AN} (0,6% agar) durante 24 horas. En cada imagen se representa la barra de escala. (c) Ensayo de sensibilidad a SDS. Las barras del gráfico representan la media (en mm) del halo de inhibición del crecimiento de GR4 y GRS577 en respuesta a la presencia en el medio de discos de papel impregnados con una solución de SDS al 10%. El asterisco indica que hay diferencia significativa de acuerdo a un análisis ANOVA (P≤0,05). (d) Apariencia mucosa (arriba) y fluorescencia (abajo) mostradas por GR4 y el transposante GRS577 crecidas en placa de MM (izda) o TY (dcha). Para observar el fenotipo fluorescente se adicionó a las placas el colorante calcoflúor (Cf) y éstas se iluminaron con luz UV. (e) Fluorescencia exhibida por mutantes simples *ntrY::Tn5* (GRS577) y *exoY* (GR4Y) y el mutante doble *exoY ntrY::Tn5* (GR4YntrY) crecidas en placas de MM suplementado con calcoflúor.

Tabla 2.2: Medida del número de flagelos y la longitud de células de *S. meliloti* GR4 y su derivado GRS577.

	Nº flagelos ^a	Longitud celular ^a
GR4	2,6 ± 0,2	1,94 ± 0,06
GRS577	0,6 ± 0,2 *	1,66 ± 0,06 *

^a Media ± error estándar a partir de un mínimo de 35 medidas para cada cepa. El asterisco indica diferencias significativas con respecto a GR4 de acuerdo a un análisis ANOVA (P≤0,05).

La mayor producción de EPS I por parte de GRS577, nos llevó a suponer que quizá la insensibilidad de este mutante a la presencia de 2-TDC se debía a un impedimento en el acceso al entorno celular, y posterior reconocimiento de la molécula, provocado por el exceso de exopolisacárido. Para investigar esta hipótesis analizamos la movilidad en superficie en presencia de 2-TDC de la cepa GR4YntrY. Como vemos en la Figura 2.9, el comportamiento de una cepa no productora de EPS I (GR4Y) fue idéntico al de la cepa parental GR4, lo que indica por un lado que este exopolisacárido no es esencial para la movilidad en superficie de GR4, algo que se había demostrado previamente en la cepa Rm1021 de *S. meliloti* (Nogales *et al.* 2012), y por otro que la producción de niveles normales de EPS I no repercute ni negativa ni positivamente en la respuesta a 2-TDC. La eliminación del EPS I en el mutante *ntrY*::Tn5, redujo aún más el desplazamiento en superficie de la bacteria en situación control, lo que parece indicar que al igual que en Rm1021, la súper-producción de EPS I puede contribuir a la translocación en superficie de GR4 (Nogales *et al.* 2012). No obstante, la incapacidad de producir EPS I sólo supuso un ligero aumento en el halo de expansión en presencia de 2-TDC con respecto al control. Aunque los análisis estadísticos indican que este aumento es significativo, no observamos que haya una recuperación importante de la movilidad, lo que indica que el exceso de EPS I no es la principal causa de la ausencia de respuesta de 2-TDC del transposante *ntrY*::Tn5.

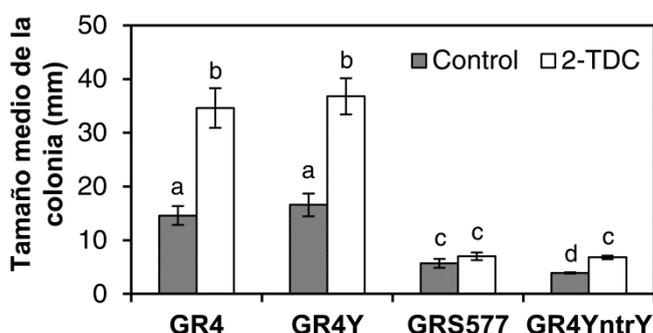


Figura 2.9: Movilidad en MM_{AN} (0,6% agar) en respuesta a 2-TDC mostrada por mutantes simples *exoY* (GR4Y) y *ntrY*::Tn5 (GRS577) y el mutante doble *exoY ntrY*::Tn5 (GR4YntrY) en comparación a la cepa silvestre GR4. Se muestra el desplazamiento medio (en mm) alcanzado por las cepas crecidas durante 24 horas. El análisis estadístico (ANOVA, P≤0,05) se realizó a partir de al menos 18 medidas obtenidas de tres experimentos independientes.

Con respecto al fenotipo simbiótico, curiosamente y a diferencia de lo que ocurre en el mutante por inserción en *ntrX* obtenido por Wang y colaboradores (2013), la cepa GRS577 es capaz de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno eficiente en plantas de alfalfa (Figura 2.10a). No se detectaron diferencias significativas en el peso seco de plantas inoculadas con el transposante en comparación a las inoculadas con la cepa silvestre GR4 (datos no mostrados). Tampoco se observaron diferencias ni en el número de nódulos formados ni en el aspecto de éstos. Por otro lado, cinéticas de nodulación revelaron que el transposante GRS577 era igual de infectivo que la cepa parental GR4 ((Figura 2.10b, círculos).

Las cinéticas de nodulación llevadas a cabo en presencia de 2-TDC revelaron que GRS577, que al menos *ex planta* es insensible a la MK, seguía presentando retraso en la formación de nódulos con respecto a la situación control, igual que la cepa silvestre (Figura 2.10b, triángulos).

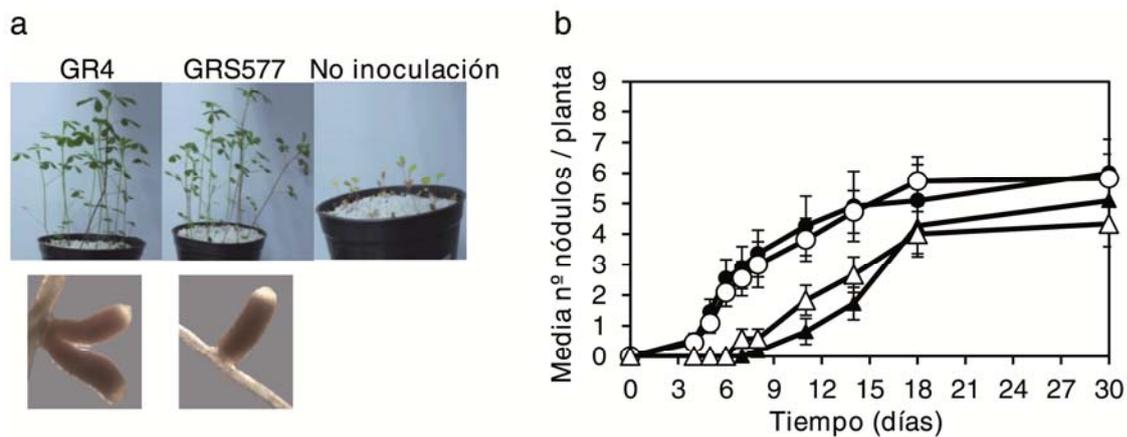


Figura 2.10: Fenotipo simbiótico de GRS577. (a) Aspecto de la parte aérea y de los nódulos de plantas de alfalfa cuatro semanas después de la inoculación con la cepa silvestre GR4 o con el mutante *ntrY::Tn5*. Además se muestra el aspecto de plantas sin inocular como control negativo. (b) Comparación de las cinéticas de nodulación de GR4 (símbolos negros) y GRS577 (símbolos blancos) inoculadas en plantas de alfalfa tratadas con 2-TDC (25 μ M) (triángulos) o etanol como control (círculos). Se muestra un experimento representativo que indica el número medio de nódulos formados por planta y su error estándar a partir de al menos diez plantas inoculadas para cada tratamiento.

Por lo tanto, aunque hay similitudes entre los fenotipos mostrados por el mutante por inserción en *ntrX* de *S. meliloti* Rm1021 descrito por Wang y colaboradores y nuestro transposante *ntrY::Tn5*, existen también importantes discrepancias. Podríamos pensar, que el no tratarse de una mutación en el mismo gen explicaría estas diferencias, pero como veremos a continuación, en GRS577 el gen *ntrX* también está afectado por la inserción del transposón. En cualquier caso, sí está bastante clara la

diferencia entre los fenotipos mostrados por el transposante *ntrY::Tn5* y la cepa de Rm1021 delecionada en *ntrY* (Wang *et al.* 2013). Por ello, decidimos analizar más pormenorizadamente qué papel desempeña cada uno de los componentes del sistema en la cepa GR4.

2.4.1. Tanto *ntrY* como *ntrX* participan en el control de la movilidad y la producción de EPS I en *S. meliloti* GR4

Las predicciones *in silico* (Schlüter *et al.* 2013) y el propio trabajo de Wang y colaboradores (2013) indican que los genes *ntrY* y *ntrX* de *S. meliloti* se transcriben juntos formando parte del mismo operón. Con el objeto de examinar un posible efecto polar en la expresión de *ntrX* provocado por la inserción del transposón en GRS577, se hizo un análisis comparativo mediante RT-qPCR de los niveles de transcritos de este gen en el mutante GRS577 y en la cepa parental GR4. Los resultados obtenidos fueron que la expresión de *ntrX* en el mutante es diez veces menor que en la cepa parental (Tabla 2.3). Del mismo modo, los niveles de transcritos correspondientes a la secuencia de *ntrY* que se encuentra aguas abajo del punto de inserción del transposón (*ntrYDT*) fueron seis veces inferiores en GRS577 en comparación con GR4. Estos datos indican que el transposón no sólo está interrumpiendo la transcripción de *ntrY*, sino que está afectando también la de *ntrX*. Por otro lado, el nivel de transcripción de la región de *ntrY* que queda aguas arriba del Tn5 (*ntrYUT*) era 7 veces mayor en el transposante que en la cepa silvestre, lo que sugiere que el sistema NtrY/NtrX de *S. meliloti* autorregula su propia expresión, bien de forma directa o indirecta.

Para determinar si los fenotipos que mostraba GRS577 eran debidos a los efectos causados por la inserción del Tn5 en *ntrY*, en *ntrX* o en ambos genes, se llevaron a cabo ensayos de complementación con distintas construcciones derivadas del plásmido pJB3Tc19 (Blatny *et al.* 1997). Así, se clonaron en dicho vector los genes *ntrY* y *ntrX* por separado y juntos (Figura A2.2 de Anexo 2.1), y los plásmidos resultantes se transfirieron a la cepa GRS577. Cuando se analizaron los fenotipos de movilidad, apariencia mucosa, fluorescencia por tinción con calcoflúor y sensibilidad a SDS, se pudo comprobar que sólo la cepa portadora del plásmido pJB3-ntrYX (577JYX) recuperaba casi por completo las características de la cepa parental (Figura 2.11).

Tabla 2.3: Expresión relativa de diferentes genes en cepas de *S. meliloti*.

Gen	Expresión relativa ^a		
	GRS577 vs. GR4	577J vs. GR4J	577JX vs. GR4J
<i>ntrX</i>	-9,9 ± 2,0	-3,6 ± 0,9	33,7 ± 5,3
<i>ntrYDT</i> ^b	-6,0 ± 1,2	ne	ne
<i>ntrYUT</i> ^b	7,0 ± 0,8	ne	ne
<i>visN</i>	-8,1 ± 20,9	ne	ne
<i>flaA</i>	-42,3 ± 8,8	ne	ne
<i>exoY</i>	-14,7 ± 1,8	ne	ne

^a Las cifras representan las veces que incrementa o disminuye (indicado con -) la expresión de los genes en GRS577 en comparación con GR4, y 577J o 577JX en comparación con GR4J, determinada mediante experimentos de RT-qPCR. Como control interno se midió la expresión del gen codificante del ARNr16S (*smc03224*). Se muestran la media y el error estándar calculados a partir de un mínimo de dos experimentos independientes con tres réplicas técnicas.

^b *ntrYDY* y *ntrYUT* corresponden a secuencias del gen *ntrY* localizadas aguas abajo o aguas arriba, respectivamente, del punto de inserción del Tn5.

Para descartar que la ausencia de complementación en el transconjugante que porta la construcción pJB3-*ntrX* (577JX) fuera debida a problemas en la transcripción del gen *ntrX*, se analizó la expresión de dicho gen en esa construcción mediante RT-qPCR. Los resultados revelaron que en comparación a la cepa parental portando el plásmido vacío (GR4J), la transcripción de *ntrX* en la cepa 577J estaba reducida, mientras que en la cepa 577JX era casi 34 veces superior (Tabla 2.3).

Por lo tanto, los estudios de complementación genética indican que en *S. meliloti* GR4 tanto *ntrY* como *ntrX* participan en el control coordinado de motilidad y producción de succinoglucano, así como también son importantes para el mantenimiento de la integridad de la envoltura celular y la resistencia de la membrana frente a agentes causantes de estrés.

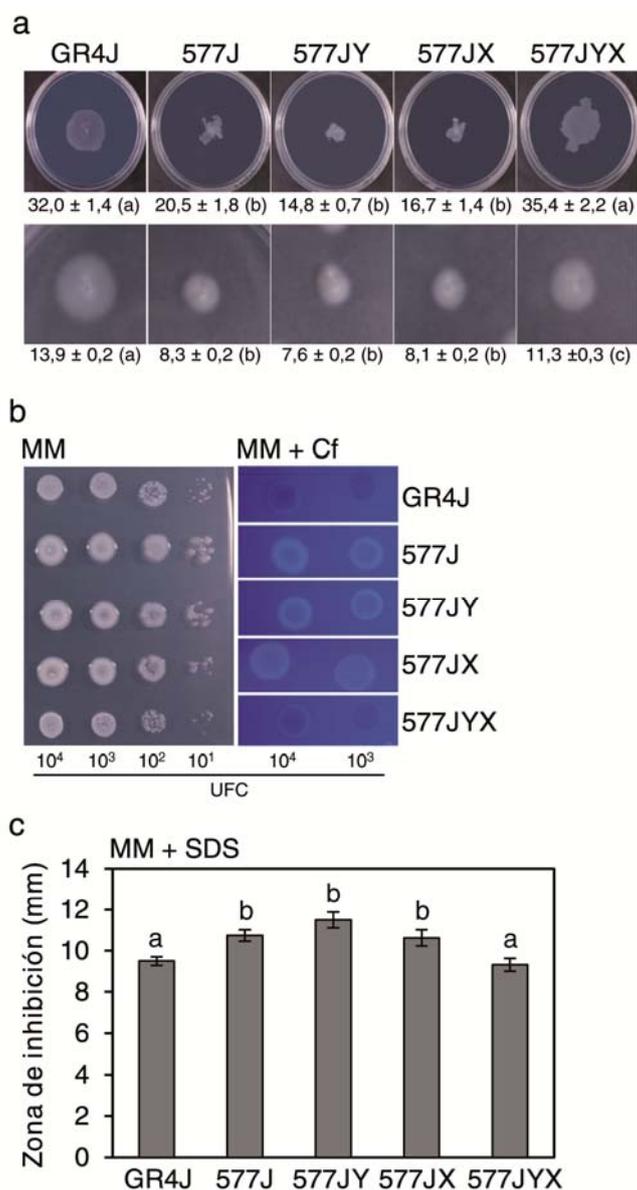


Figura 2.11: Complementación de la movilidad, la producción de EPS I y la tolerancia a SDS en GRS577. (a) Ensayos de movilidad en superficie (fila superior) y *swimming* (fila inferior). Debajo de cada fotografía se muestran la media y el error estándar de las zonas de migración (en mm), calculados a partir de 18 medidas tomadas de experimentos independientes. Las diferencias significativas (análisis ANOVA, $P \leq 0,05$) se indican con distintas letras. **(b)** Aspecto mucoso (izquierda) y fluorescencia (derecha) exhibidos por las distintas cepas en MM o MM suplementado con calcoflúor, respectivamente. El número de UFC aplicadas en cada gota se indica debajo de la figura. **(c)** Inhibición del crecimiento causada por la presencia de filtros de papel conteniendo SDS al 10%. Las distintas letras indican diferencias significativas (análisis ANOVA, $P \leq 0,05$).

En paralelo a los ensayos de complementación, y teniendo en cuenta las observaciones de Wang y colaboradores que concluyen que únicamente NtrX es esencial para la viabilidad de Rm1021, ya que la delección simple en *ntrY* sí la podían llevar a cabo en dicha cepa, se intentó deleccionar *ntrY* en GR4. Sin embargo, tras varios intentos utilizando las técnicas estándar de intercambio alélico normalmente empleadas en *S. meliloti*, no se pudo conseguir el mutante por delección. En la Figura A2.3 de Anexo 2.1 se detalla la estrategia utilizada para diseñar la versión deleccionada de *ntrY* y realizar el intercambio alélico. Barajando la hipótesis de que la delección de *ntrY* pudiera ser letal en el caso de GR4, se procedió a forzar el intercambio alélico en cepas portadoras de las construcciones pJB3-*ntrY*, pJB3-*ntrX* y pJB3-*ntrYX* (y también el plásmido vacío como control). Únicamente se pudo conseguir deleccionar el gen *ntrY*

cuando estaba presente la construcción pJB3-*ntrYX*; en aquellas cepas que portaban el plásmido vacío o las otras dos construcciones no se pudo obtener la versión deletada de *ntrY* (Figura 2.12a). Decidimos también intentar esta misma estrategia en el fondo genético de Rm1021 y se obtuvieron los mismos resultados (Figura 2.12b). En este punto es importante mencionar que para las células portadoras de la construcción pJB3-*ntrY* se obtuvieron algunos clones carentes de la copia cromosómica de la versión silvestre de *ntrY* (línea 5 de las Figuras 2.12a y 2.12b); sin embargo, en esos mismos clones también se perdía la copia correspondiente al *ntrY* plasmídico y aparecían señales de hibridación con el tamaño esperado para la versión deletada de *ntrY*, pero demasiado intensas como para proceder de la copia cromosómica. Estos resultados sugieren que lo que está ocurriendo en el interior de esas células es una especie de reordenamiento de secuencias de *ntrY*. Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales, la delección completa de la secuencia de *ntrY* es letal tanto en GR4 como en Rm1021, pero no lo es la interrupción mediante la inserción de un transposón.

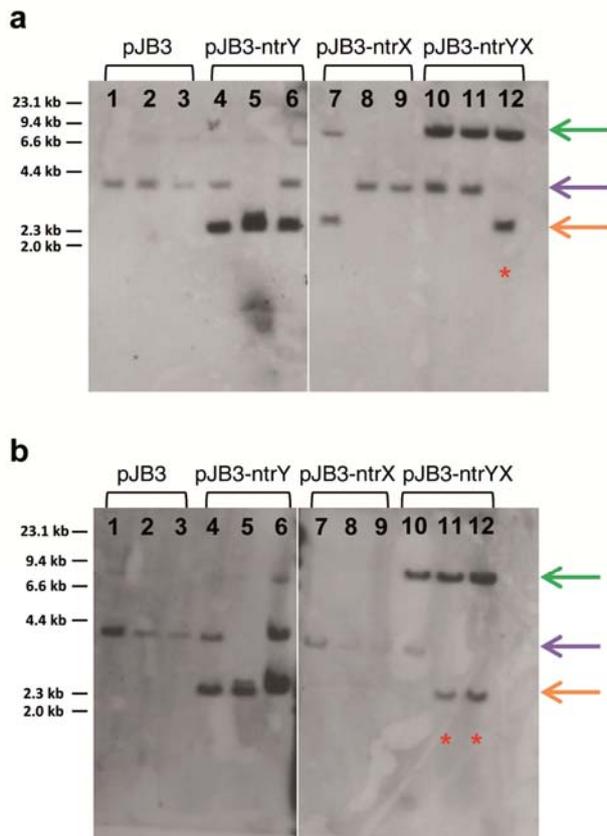


Figura 2.12: Análisis mediante Southern blot de los teóricos candidatos de GR4 (a) y Rm1021 (b) para la delección cromosómica de *ntrY*. A la izquierda de cada imagen se indica la altura a la que migran las bandas de un marcador de ADN de referencia. A la derecha se marcan con flechas la altura de la señal de hibridación esperada para la copia plasmídica (verde), la copia cromosómica silvestre (violeta) y la copia cromosómica deletada (naranja) de *ntrY*. Los mutantes en los que se consiguió deleccionar el gen *ntrY* se marcan con asterisco. Para más detalles de la estrategia ver Figura A2.2 de Anexo 2.1.

2.4.2. Otros fenotipos asociados a la cepa GRS577: mayor formación de biopelículas y mayor sensibilidad a estrés salino

Las cepas de *S. meliloti* que producen exceso de succinoglucano exhiben una mayor capacidad para formar biopelículas sobre superficies abióticas (Fujishige *et al.* 2006a). De acuerdo con esto, pudimos comprobar que el transposante GRS577 mostró mayor habilidad para desarrollar biopelículas en superficie de vidrio en comparación a la cepa parental GR4 (Figura 2.13a). Al igual que ocurría con los anteriores fenotipos estudiados, esta mayor capacidad de formación de biofilms sólo se suprimió con la construcción pJB3-*ntrYX* y no con las que expresaban los genes individualmente. Además, la eliminación de la síntesis de EPS I en la cepa GR4YntrY (*exoY*, *ntrY*) redujo el biofilm a niveles similares a los mostrados por la cepa silvestre (Figura 2.13a), confirmando que la súper-producción de EPS I era la responsable de este fenotipo de mayor capacidad de formar biopelículas exhibido por el mutante.

Por otro lado, dado que *ntrY* había sido identificado en *R. tropici* CIAT899 como un gen implicado en la tolerancia a estrés salino (Nogales *et al.* 2002), decidimos evaluar el crecimiento del transposante en alta concentración de cloruro sódico (NaCl). La cepa GRS577 no fue capaz de crecer en placas de MM conteniendo 300 mM de NaCl, y tampoco lo fueron las cepas 577J, 577JY y 577JX (Figura 2.13b). Únicamente la expresión conjunta de *ntrYntrX* consiguió recuperar el crecimiento bacteriano en alta concentración de sal, indicando que en *S. meliloti* el sistema NtrY/NtrX regula la tolerancia a estrés salino durante el crecimiento en vida libre.

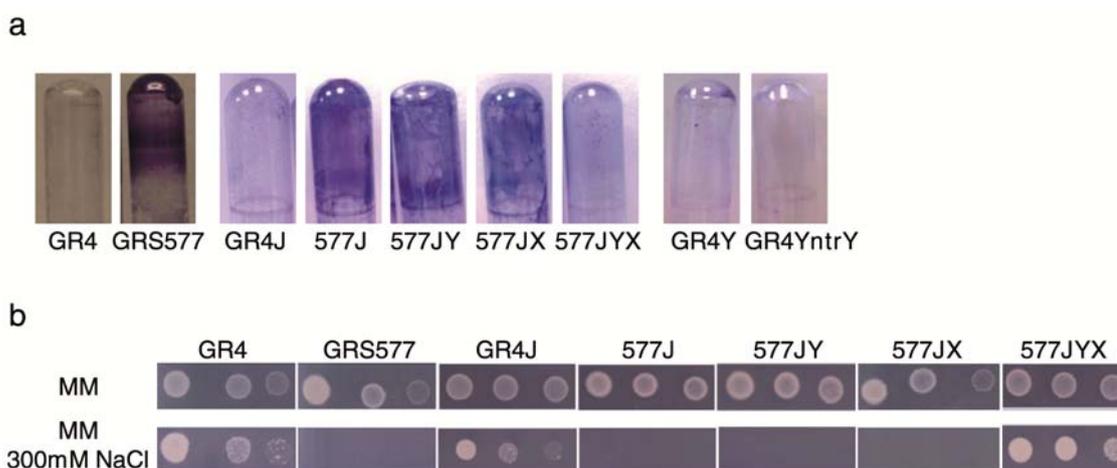


Figura 2.13: (a) Formación de biopelículas en tubo de vidrio de distintas cepas de *S. meliloti* crecidas en MM líquido. **(b)** Capacidad para crecer en MM conteniendo NaCl (300 mM) de distintas cepas de *S. meliloti*. Sobre la superficie de placas conteniendo MM (fila superior) o MM suplementado con 300 mM de NaCl (fila inferior) se inocularon gotas conteniendo (de izquierda a derecha) 10⁶, 10⁵, y 10⁴ UFC. Las placas se incubaron a 30 °C durante 3 días. Se muestran imágenes representativas de al menos tres experimentos independientes.

2.4.3. Los defectos en motilidad de GRS577 dificultan la colonización de raíz y reducen la competitividad por la nodulación de alfalfa

Como se ha mencionado previamente, GRS577 es capaz de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en alfalfa. Como se ha indicado en la Introducción, se sabe que la movilidad no es un factor clave en los procesos fisiológicos que conducen a la formación del nódulo y la fijación del nitrógeno, pero sí se ha asociado con la eficiencia y la capacidad competitiva durante la nodulación. Por ello, nos propusimos analizar si estos fenotipos simbióticos estaban alterados en el transposante *ntrY::Tn5*, dada la reducida motilidad y el escaso número de flagelos que forma.

Mientras que en los ensayos de nodulación con cultivos monoxénicos la eficiencia en la formación de nódulos de GRS577 era similar a la de la cepa parental GR4 (Figura 2.10b), cuando se realizaron ensayos de competitividad en los que se co-inoculaban ambas cepas en una relación 1:1 el mutante ocupaba aproximadamente un 50% menos de nódulos que la cepa silvestre. Incluso aumentando la ratio de células inoculadas a un valor de 10:1 en favor del mutante, el porcentaje de nódulos ocupados era sólo de un 29%, lo que revela una baja capacidad competitiva frente a GR4 por la ocupación de nódulos (Figura 2.14a). La complementación con la construcción pJB3-*ntrYX* restauró la habilidad de GRS577 para competir con la cepa silvestre (Figura 2.14a).

Con el fin de profundizar más en el porqué de esta baja competitividad se evaluó la habilidad del transposante para adherirse y colonizar las raíces de plantas de alfalfa crecidas en cultivo hidropónico. Para ello se contabilizó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) asociadas estrechamente a la raíz a distintos tiempos tras la inoculación. No se detectaron diferencias significativas entre GR4 y GRS577 en las etapas iniciales de adhesión (dos horas pos-inoculación). Sin embargo, a tiempos de incubación más prolongados se observó una clara diferencia en la colonización de raíces de alfalfa, ya que la cepa parental presentaba de 10 a 100 veces más células por gramo de raíz que el transposante (Figura 2.14b). Este resultado indica que el mutante GRS577 está severamente afectado en la capacidad para colonizar la superficie de la raíz, y esto podría explicar la ventaja competitiva de la cepa silvestre GR4 por la ocupación de nódulos en los ensayos de competitividad.

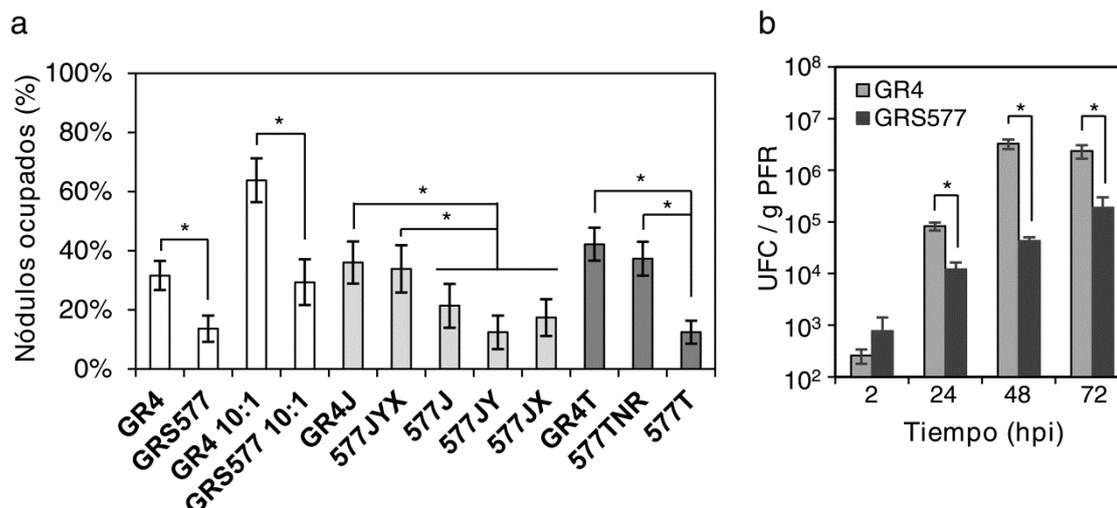


Figura 2.14: Fenotipo simbiótico de distintas cepas de *S. meliloti*. (a) Ensayos de competitividad en nodulación. Los datos representan el porcentaje de nódulos ocupados por cada cepa de rizobio tras co-inocular con la cepa control marcada GR4 (pGUS3) en una proporción 1:1 ó 10:1 (se indica en cada caso). (b) Ensayos de adsorción/colonización. El gráfico de barras representa las UFC recogidas de raíces de alfalfa a distintos tiempos tras la inoculación. Los datos se expresan por gramo de peso fresco de raíz (PFR). Las barras de error indican el error estándar de la media, calculado a partir de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$) se indican con asterisco.

Una posible causa que explique, al menos de forma parcial, la menor colonización mostrada por el mutante podría ser su gran defecto en motilidad causado a su vez por la menor producción de flagelos. Pensando en que un incremento en dicha producción pudiese restaurar la capacidad competitiva de GRS577, decidimos sobre-expresar en dicha cepa los genes *visNR*, que constituyen el regulador maestro del regulón flagelar. En primer lugar se comprobó que la cepa que portaba esta construcción (577TNR) recuperaba el número de flagelos y la motilidad *swimming* y *swarming* a niveles comparables a los de la cepa parental (GR4T) (Figura 2.15). Los ensayos de nodulación en plantas de alfalfa revelaron que la sobreexpresión de *VisNR* conseguía recuperar la capacidad competitiva por la nodulación de GRS577 también a niveles similares a los presentados por la cepa silvestre (Figura 2.14a). Estos resultados confirman que la menor competitividad exhibida por el transposante GRS577 es resultado de su menor capacidad para desplazarse y colonizar eficientemente las raíces de alfalfa.

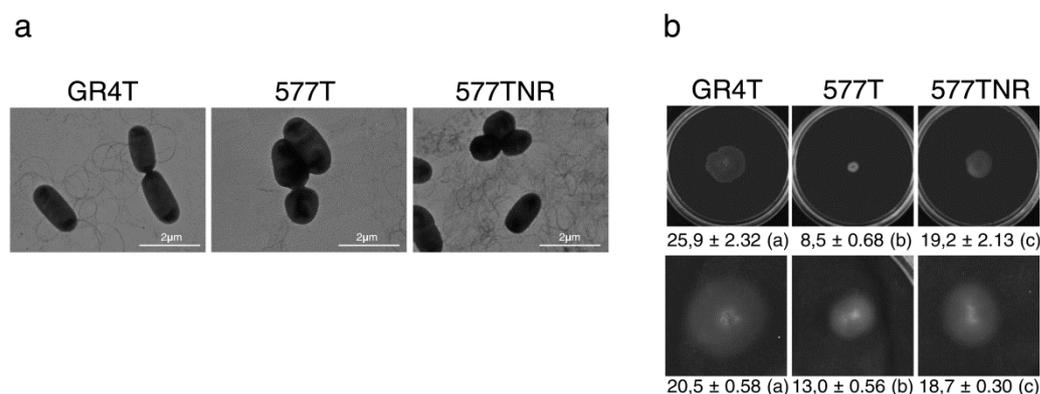


Figura 2.15: La expresión ectópica de VisNR en GRS577 restaura la producción de flagelos y la movilidad. (a) Imágenes de TEM donde se muestran los flagelos presentes en células de GR4 y GRS577 portando el plásmido pTE3 vacío (GR4T y GRS577T, respectivamente), y células del transposante conteniendo el plásmido pTE3-visNR (577TNR), crecidas en MM_{AN} semisólido (0,6% agar). En cada figura se muestra la barra de escala. **(b)** Movilidad en superficie (panel superior) y *swimming* (panel inferior) de las cepas GR4T, 577T y 577TNR tras 24 y 72 horas de incubación, respectivamente. La media y el error estándar de los halos de migración (en mm), calculados a partir de 18 medidas en tres experimentos independientes, se muestran debajo de cada imagen. Los valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente de acuerdo a un test ANOVA ($P \leq 0,05$).

2.4.4. Análisis transcriptómico de GRS577

Con el objetivo de investigar qué genes podrían estar potencialmente regulados por el sistema de dos componentes NtrY/NtrX en *S. meliloti* GR4, se compararon los perfiles de expresión global del transposante GRS577 y de la cepa silvestre GR4 tras crecimiento en MM líquido hasta una fase de crecimiento exponencial.

Tras un análisis transcriptómico empleando la técnica de *microarrays* aparecieron un total de 231 genes diferencialmente expresados entre ambas cepas: 143 (62%) estaban reprimidos en el transposante, mientras que los 88 restantes (38%) estaban inducidos. Curiosamente, no hubo una distribución equitativa de genes inducidos y reprimidos entre los distintos replicones del genoma de *S. meliloti*. Así, 68 de los 143 genes que mostraban menor expresión en el mutante (47,6%) estaban localizados en el megaplásmido homólogo a pSymA (pRmeGR4c) mientras que el 40,9% de los genes inducidos (36 de 88) pertenecían al megaplásmido homólogo a pSymB (pRmeGR4d), porcentajes significativamente superiores a los esperados para una distribución uniforme, que son del 21% y 25%, respectivamente. Estos resultados sugieren que, en condiciones de vida libre, el sistema NtrY/NtrX directa o indirectamente promueve la expresión de genes localizados en pSymA, mientras que reprime los de pSymB. Los genes diferencialmente expresados obtenidos en este

análisis transcriptómico junto con su nivel de expresión relativa (valor de M) están recogidos en las Tablas A2.1 y A2.2 de Anexo 2.2.

Entre los genes reprimidos en la cepa mutante GRS577 se pueden distinguir tres bloques principales: el bloque de mayor tamaño comprende un total de 51 genes (36%) que codifican proteínas de función desconocida; el siguiente está compuesto por 33 genes (23%) relacionados con motilidad y quimiotaxis, entre los que se incluyen los reguladores transcripcionales de la clase IA y IB del regulón flagelar *visN* y *rem* (Rotter *et al.* 2006; Sourjik *et al.* 2000); por último, se distingue un tercer grupo formado por 28 genes del megaplásmido pSymA (19%) cuya expresión se induce normalmente en condiciones de crecimiento en microaerobiosis. Los genes pertenecientes a este último grupo son: 9 genes implicados en el proceso de desnitrificación tales como el operón completo *nosRZDFYLX*, que codifica la óxido nítrico reductasa encargada de transformar el N_2O en N_2 , y los dos primeros genes de los operones *nap* y *nor* (*napE* y *norE*), que codifican, respectivamente, la nitrato reductasa periplásmica y la óxido nítrico reductasa, enzimas encargadas de la transformación de NO_3^- en NO_2^- y de NO_2 en NO (Torres *et al.* 2014; Holloway *et al.* 1996); otros 2 genes también relacionados con desnitrificación (*azu1* y *hemN*) (Torres *et al.* 2014); 14 genes *fix* incluyendo las copias 1 y 2 del operón *fixNOQP*, que codifica la citocromo oxidasa de alta afinidad *cbb₃* requerida para la respiración en el ambiente microaeróbico del nódulo (Bobik *et al.* 2006; Torres *et al.* 2013); y los genes *arcA1-arcB-arcD* que pertenecen a la ruta metabólica de la arginina deiminasa, la ruta anaeróbica para la degradación de arginina más común en bacterias (Bobik *et al.* 2006). Además de estos tres grupos, cabe mencionar también dentro de los genes reprimidos en el mutante GRS577 genes responsables de la tolerancia frente a distintos tipos de estrés; aquí encontramos los genes *gst13* (glutatión S-transferasa), *clpB* (proteasa de estrés por calor) y genes codificantes de proteínas de choque térmico, que indican que el mutante tiene disminuida su capacidad para tolerar condiciones ambientales adversas. Además, la presencia del gen *ntrX* dentro del grupo de genes con expresión reducida en el transcriptoma de GRS577 confirmó los resultados obtenidos por RT-qPCR mencionados en el apartado 2.4.1 (Tabla 2.3).

Al igual que en el caso de los genes reprimidos, muchos de los genes inducidos en el transposante *ntrY::Tn5* resultaron ser genes codificantes de proteínas con función desconocida (34%). Además, en concordancia con la mayor producción de EPS I que presenta GRS577, hay que destacar en el grupo de genes inducidos la aparición de 11 genes *exo*, responsables de la biosíntesis (*exoY*, *exoQ*, *exoZ*, *exoH*, *exoN*, *exoO*,

exoP, *exoU*, *exoV*, *exoW*) y despolimerización (*exoK*) de este exopolisacárido (Janczarek 2011). También es interesante la inducción de algunos genes codificantes tanto de componentes estructurales como de enzimas modificadoras de la pared celular, tales como *lysM*, *murF*, *mrcA2*, *ampC*, *rlpA*, *ropB1*, *sma2295* o *smc0423*. Finalmente, el gen *ntrY* apareció también entre los genes inducidos en el transposante, lo que confirma los datos obtenidos por RT-qPCR (Tabla 2.3).

Además de los datos de expresión ya mencionados para *ntrX* y *ntrY*, se confirmó mediante RT-qPCR la expresión diferencial entre GR4 y GRS577 de los genes *visN*, *flaA* y *exoY* (Tabla 2.3), lo que validó los resultados obtenidos con el *microarray*.

2.4.5. El sistema NtrY/NtrX de *S. meliloti* regula la expresión de los genes de desnitrificación y del gen *nifA*

En la bacteria *S. meliloti*, la expresión de los genes que participan en el proceso de desnitrificación *nap*, *nir*, *nor* y *nos*, que codifican las enzimas reductasas para nitrato, nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso, respectivamente, se inducen en microaerobiosis (2% de O₂) y en presencia de nitrato (Becker *et al* 2004; Torres *et al.* 2014). Aunque el análisis transcriptómico descrito en el apartado anterior se hizo a partir de cultivos celulares crecidos en condiciones suficientes de aireación, se observó una expresión reducida de algunos de estos genes (*napE*, *norE*, *nosR* y *nosZDFYLX*) en la cepa GRS577 con respecto a la cepa silvestre GR4. En *Brucella* spp. el sistema NtrY/NtrX induce la expresión de las enzimas encargadas de la respiración del nitrato en condiciones microaeróbicas (Carrica *et al.* 2012). Esto nos llevó a plantear si en *S. meliloti* dicho sistema podría desempeñar un papel similar. Por ello, utilizando fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ*, analizamos la expresión de los genes *nirK* (nitrito reductasa) y *norB* (óxido nítrico reductasa) en *S. meliloti* GR4 y GRS577 crecidos en MM líquido o MM suplementado con KNO₃ (MMN) en condiciones de crecimiento aeróbico y microaeróbico (2% O₂). Junto con estas fusiones, se midió también la actividad β-galactosidasa de las cepas silvestre y mutante conteniendo los plásmidos pCHK57 (*pnifA::lacZ*) y pGD499 (*pnpt::lacZ*), los cuales se utilizaron como control de inducción de la expresión por microaerobiosis y de expresión constitutiva, respectivamente (Ditta *et al.* 1987; 1985).

En cuanto a la expresión del promotor constitutivo *npt*, no se obtuvieron diferencias significativas entre GR4 y GRS577 en ninguna de las cuatro condiciones

experimentales analizadas (datos no mostrados), lo que descartaba la existencia de efectos inespecíficos en la expresión génica.

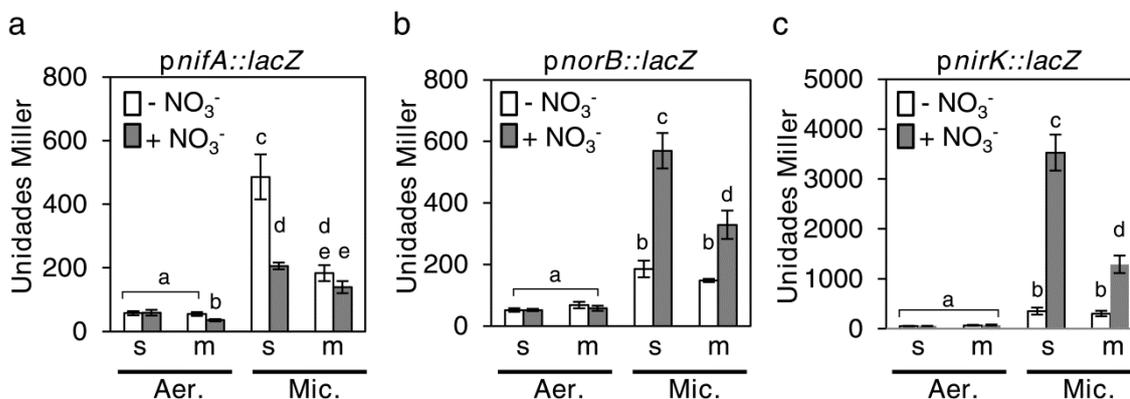


Figura 2.16: Expresión de las fusiones transcripcionales de los genes *nifA* (a), *norB* (b) y *nirK* (c) a *lacZ* en *S. meliloti* GR4 (s) y el mutante GRS577 (m). La actividad de los promotores de estos genes se midió en ambas cepas crecidas en MM líquido (barras blancas), o dicho medio suplementado con KNO₃ (10 mM) (barras grises), en condiciones de aerobiosis (Aer.) o microaerobiosis (Mic.). Los gráficos muestran las medias y el error estándar de tres experimentos independientes con dos réplicas técnicas. Las diferencias significativas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$) se indican con distintas letras.

En condiciones microaeróbicas, la expresión del gen *nifA* se incrementó hasta 8 veces en la cepa parental GR4 crecida en MM con respecto a la expresión mostrada en condiciones de aerobiosis (Figura 2.16a). La presencia de nitrato redujo a casi la mitad los niveles de expresión de *nifA* en GR4 crecida en microaerobiosis. Este efecto negativo del nitrato sobre la expresión de *nifA* en *S. meliloti* cuando crece en condiciones de vida libre en microaerobiosis ya se había descrito anteriormente (Noonan *et al.* 1992; Fischer 1994). En cambio, los niveles de expresión de *nifA* en el mutante GRS577 crecido en microaerobiosis y en ausencia de nitrato eran más de dos veces inferiores a lo observado para GR4, y además no cambiaban en presencia de nitrato (Figura 2.15a). Estos resultados sugieren que en condiciones de crecimiento en microaerobiosis se requiere del sistema NtrY/NtrX para alcanzar la máxima expresión del gen *nifA* en ausencia de nitrato.

En ausencia de nitrato, la expresión de los genes *norB* y *nirK* se incrementó de forma similar tanto en GR4 como en GRS577 en respuesta a la bajada en los niveles de oxígeno (Figura 2.16b y 2.16c). La presencia de nitrato en condiciones microaeróbicas incrementó significativamente la expresión de *norB* (3 veces) y *nirK* (10 veces) en la cepa GR4. Sin embargo, aunque la adición de nitrato también causó un incremento en la expresión de estos genes en el mutante GRS577, los niveles que se alcanzaron fueron significativamente menores en comparación a la cepa parental (1,7

y 2,7 veces inferiores, respectivamente). Estos resultados sugieren que el sistema NtrY/NtrX es responsable de permitir que se alcance la máxima expresión de algunas enzimas que participan en desnitrificación en condiciones de microaerobiosis y cuando el nitrato está presente en el medio.

A pesar de las diferencias a nivel de expresión génica entre GR4 y el transposante GRS577, que a priori sugieren una mayor eficiencia por parte de la cepa parental para obtener energía a partir de la respiración de nitrato en condiciones de deficiencia de oxígeno, no se observó diferencia en la tasa de crecimiento de ambas bacterias en ninguna de las condiciones ensayadas (datos no mostrados). Esto indica que, si bien el sistema NtrY/NtrX puede ser importante como modulador de la expresión para conseguir una mejor adaptación a condiciones de vida microaeróbicas, no es un regulador clave.

ANEXOS CAPÍTULO 2

Anexo 2.1 Estrategias para la construcción de los distintos plásmidos y cepas empleados en el Capítulo 2.

Construcción de la cepa GR4YntrY (exoY ntrY::Tn5)

En primer lugar se obtuvo el mutante defectivo en producción de EPS I GR4Y. Para ello se introdujo el plásmido que contenía la versión delecionada de dicho gen pK18- Δ exoY (Nogales *et al.* 2012) en la cepa GR4 mediante conjugación biparental con la cepa S17.1 de *E. coli*. Esta construcción está basada en el vector suicida pK18*mobsacB*, que confiere resistencia a Km y sensibilidad a sacarosa (Schäfer *et al.* 1994). Este vector es incapaz de replicarse en cepas de *Rhizobium*, con lo que se favorece su integración en el cromosoma por recombinación homóloga, de forma que se pueden seleccionar aquellos clones donde se haya producido el intercambio alélico combinando la selección en Km y en sacarosa. Para comprobar que la deleción había tenido lugar de forma correcta se realizó la hibridación del ADN genómico de los distintos candidatos con una sonda específica.

Una vez construida la cepa GR4Y se le transfirió el plásmido pSUP202-E2175, que portaba un fragmento de ADN genómico aislado del transposante GRS2175 que contenía el Tn5 insertado en el gen *ntrY*. Dicho fragmento se había obtenido mediante digestión con *EcoRI* del ADN genómico de GRS2175 y posterior clonaje en el vector suicida pSUP202 también digerido con *EcoRI*. El plásmido pSUP202 (Simon *et al.* 1983), que confiere resistencia a Tc, también se puede emplear para realizar intercambio alélico en cepas de *Rhizobium*. Se decidió utilizar la construcción *ntrY*::Tn5 derivada de GRS2175 en lugar de la de GRS577 porque los brazos de ADN que flanquean el Tn5 en esa cepa tienen una longitud más apropiada para favorecer el intercambio alélico por recombinación homóloga (ver Figura A2.1a). Mediante la selección adecuada usando los antibióticos Tc y Km, se obtuvieron los teóricos transconjugantes en los que la copia silvestre de *ntrY* había sido sustituida por la versión interrumpida por el transposón. De nuevo, se llevaron a cabo análisis de hibridación de ADN genómico para corroborar que el intercambio alélico se había producido correctamente.

En la Figura A2.1b se representan esquemáticamente las construcciones empleadas para obtener esta cepa.

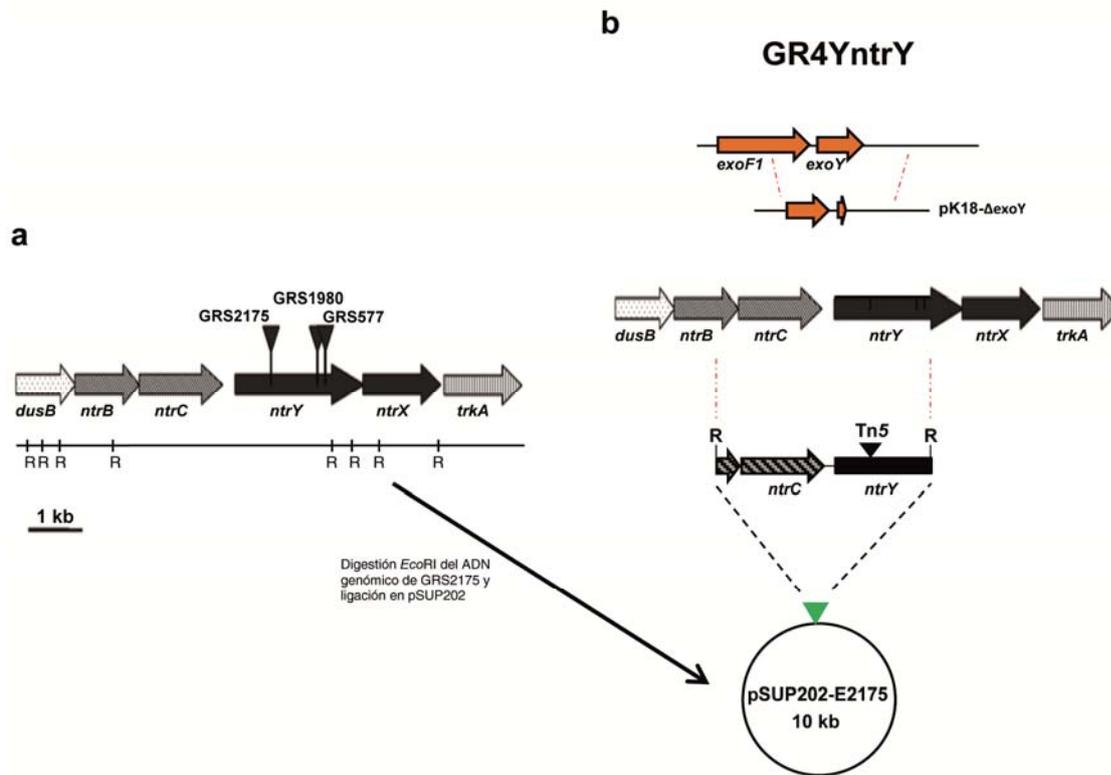


Figura A2.1: (a) Contexto genómico del gen *ntrY* de *S. meliloti*. Los triángulos indican el sitio de inserción del Tn5 en los transposantes GRS2175, GRS1980 y GRS577. (b) Esquema de las construcciones plasmídicas usadas para la obtención de la cepa GR4YntrY. El alelo mutante para el gen *exoY* se obtuvo mediante recombinación homóloga con el plásmido suicida pK18-Δ*exoY* portando la versión deletada de dicho gen. La mutación en *ntrY* se consiguió por intercambio alélico entre la copia silvestre y la copia que contenía el Tn5 procedente del transposante GRS2175 integrada en el plásmido pSUP202-E2175. Se muestran la posición de las dianas de restricción *EcoRI* (R). En la figura se incluye la barra de escala.

Construcción de los plásmidos pJB3-*ntrY*, pJB3-*ntrX* y pJB3-*ntrYX* usados para la complementación de GRS577

La estrategia para obtener estas construcciones se resume en la Figura A2.2.

Para obtener la construcción pJB3-*ntrYX* se amplificaron los genes *ntrYX* (incluyendo también su posible región promotora) a partir de ADN genómico de *S. meliloti* GR4 utilizando los cebadores delIntrYX.1 y delIntrYX.4 (Tabla M4 en Materiales y Métodos). El producto de amplificación resultante, de 5070 pb y flanqueado por los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *Bam*HI, se clonó en el vector pCR-XL-TOPO, dando lugar al vector pTOPO-*ntrYX*. Tras comprobar que la secuencia amplificada no tenía errores, se digirió pTOPO-*ntrYX* con *Bam*HI, se aisló nuestro

fragmento de interés de 5 kb y se subclonó en el vector pJB3Tc19, también digerido con dicha enzima.

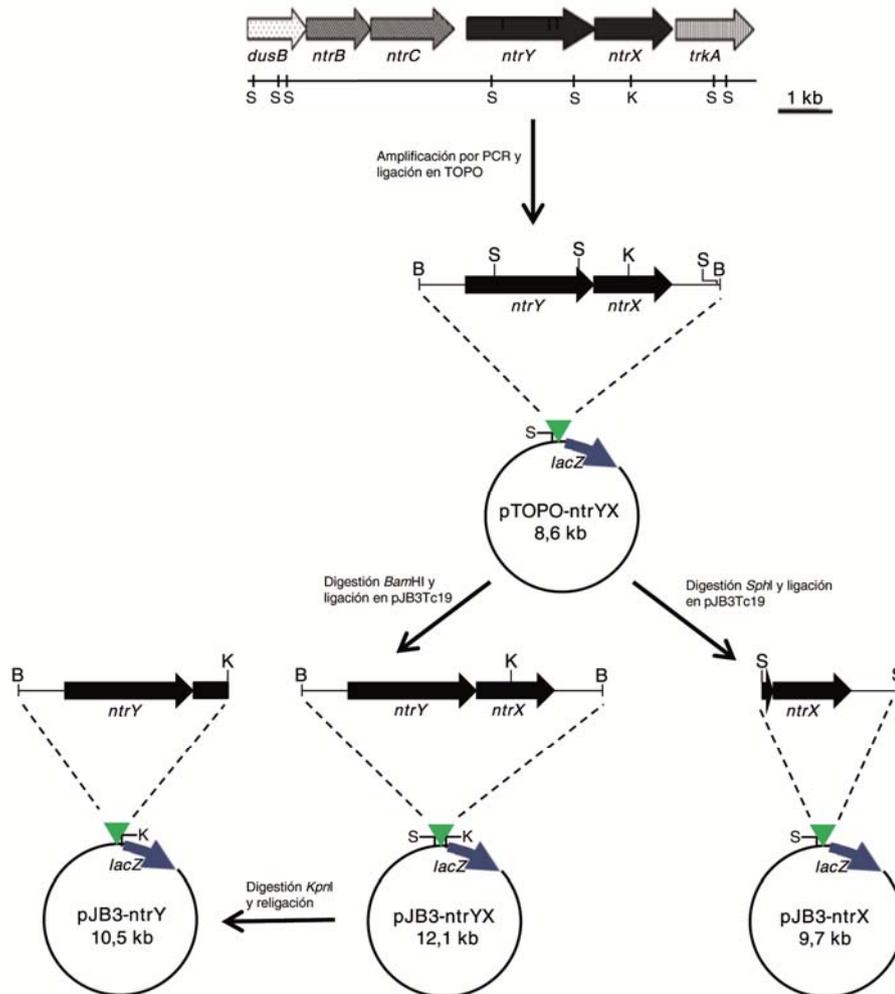


Figura A2.2: Estrategia para la construcción de los plásmidos basados en pJB3Tc19 empleados en los ensayos de complementación. En la figura se señalan las dianas de restricción empleadas para conseguir las distintas construcciones: *Bam*HI (B), *Kpn*I (K), *Sph*I (S). Se incluye la barra de escala.

Para construir un plásmido en el que se expresara el gen *ntrY* pero no *ntrX* se aprovechó la existencia de un sitio de restricción *Kpn*I en la secuencia codificante del segundo gen. Así, el plásmido pJB3-ntrYX se digirió con esta enzima, se aisló el fragmento de ADN de mayor tamaño (10519 pb) y finalmente se religó. De esta forma se consiguió el plásmido pJB3-ntrY que contenía toda la secuencia codificante de *ntrY* y la versión truncada de *ntrX*.

Finalmente, para obtener la construcción pJB3-ntrX se digirió el plásmido pTOPO-ntrYX con la enzima *SphI* y el fragmento de 2590 pb, que contenía toda la secuencia codificante de *ntrX* y una pequeña parte del final de *ntrY*, se aisló y se subclonó en pJB3Tc19 digerido con dicha enzima. Posteriormente se comprobó la orientación del fragmento mediante digestión con *KpnI*, para seleccionar aquella construcción en la que la transcripción de *ntrX* fuera posible desde el promotor *lacZ* del propio plásmido.

Una vez construidos los plásmidos se introdujeron en la cepa movilizadora S17.1 de *E. coli* y posteriormente se transfirieron por conjugación biparental a GRS577, generando las cepas 577JYX, 577JY y 577JX, respectivamente. También se introdujo como control el plásmido vacío pJB3Tc19 (577J). Los transconjugantes se seleccionaron en MM conteniendo Km y Tc.

Estrategia para la delección en fase del gen *ntrY*

En la Figura A2.3 se muestran esquemáticamente las construcciones empleadas en esta estrategia.

En primer lugar se generó la versión mutada del gen *ntrY* para el posterior intercambio alélico, mediante PCR solapante. Se amplificaron por PCR, utilizando como molde ADN genómico de GR4, dos fragmentos de 802 (PI) y 623 (PII) pb con las parejas de cebadores delIntrY-1/delIntrY-2 y delIntrY-3/delIntrY-4, respectivamente (Tabla M4). Dichos productos comprendían la región aguas arriba y aguas abajo, respectivamente, de la secuencia codificante de *ntrY*. A continuación se llevó a cabo una segunda reacción de PCR en la que como molde se emplearon los fragmentos PI y PII solapantes obtenidos en la PCR anterior y los cebadores delIntrY-1/delIntrY-4, los cuales generaban extremos *EcoRI*. Dicho producto de fusión se clonó en el vector pCR-XL-TOPO y se secuenció para corroborar que no se habían introducido errores durante las rondas de PCR. Finalmente, el inserto *EcoRI*, que contenía la versión mutada del gen *ntrY*, se aisló del vector pCR-XL-TOPO y se subclonó en pK18*mobsacB* digerido con esa misma enzima, dando lugar al plásmido pK18- Δ ntrY.

Seguidamente se procedió a introducir la construcción pK18- Δ ntrY en la cepa GR4 mediante conjugación biparental, y los transconjugantes se seleccionaron sembrando en MM suplementado con Km. De las colonias aparecidas se seleccionaron aquellas que fueron Km^r/Sacarosa^s, lo que indicaba que tenían integrada la construcción pK18 en su genoma. A algunos de estos clones se les transfirió cada una de las construcciones basadas en pJB3Tc19 que se habían diseñado para los experimentos

de complementación (pJB3-ntrYX, pJB3-ntrY, pJB3-ntrX y el plásmido pJB3 vacío). La selección en este caso se hizo en MM suplementado con Km y Tc.

Finalmente, tras crecimiento en MM líquido con Tc, se seleccionaron los clones en los que la segregación del plásmido pK18*mobsacB* había tenido lugar, en MM suplementado con sacarosa y Tc. Para comprobar que el intercambio alélico había ocurrido correctamente, se llevaron a cabo análisis de hibridación del ADN genómico de algunos de los clones Tc^r/Km^s/Sacarosa^r.

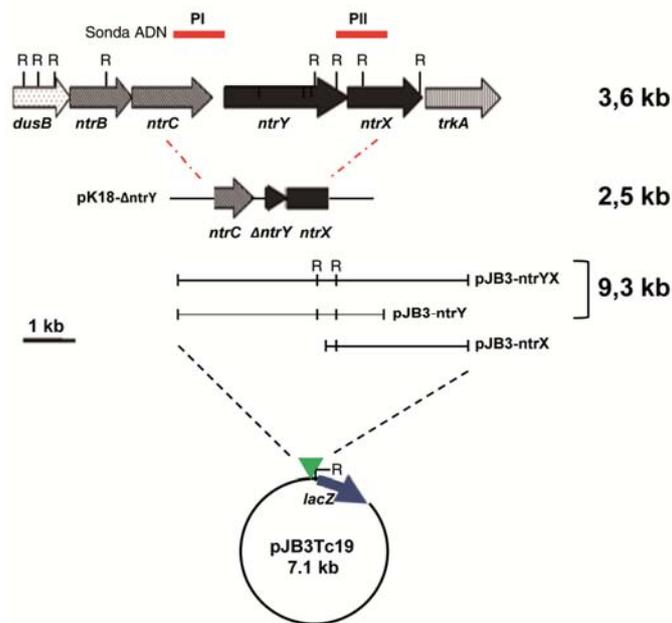


Figura A2.3: Estrategia para la detección de *ntrY* en cepas de *S. meliloti* GR4 portadoras de los plásmidos pJB3, pJB3-ntrYX, pJB3-ntrY y pJB3-ntrX. La construcción de la versión deletcionada de *ntrY* se hizo mediante PCR solapante amplificando el producto de fusión de los productos de PCR PI y PII. El fragmento PI se empleó como sonda en los análisis de hibridación. A la derecha se indica el tamaño esperado de la señal de hibridación entre la sonda y el correspondiente fragmento *EcoRI* (R) resultante de la digestión del ADN genómico de cada una de las cepas. En la figura se muestra la barra de escala.

Construcción del plásmido pTE3-visNR para la sobreexpresión del regulador máster visNR

Para la construcción de este plásmido se amplificó desde ADN genómico de *S. meliloti* Rm1021 un fragmento de 1812 pb utilizando los cebadores visNR-U y visNR-R (Tabla M4). Dicho fragmento, que contenía la secuencia codificante de los genes *visNR* flanqueada por dos sitios de reconocimiento para la enzima *BglII*, se clonó en el plásmido pCR-XL-TOPO y posteriormente se secuenció. Finalmente, se subclonó en el vector pTE3 (Egelhoff & Long, 1985) digerido con la enzima *BamHI* (compatible con *BglII*), seleccionando la construcción en la que los genes *visNR* estaban en la orientación correcta con respecto al promotor *trp* del plásmido. La construcción pTE3-visNR, así como el plásmido pTE3 vacío, se transfirieron por conjugación biparental

con S17.1 de *E. coli* a GRS577, generando las cepas 577TNR y 577T, respectivamente.

Construcción de las fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *norB* y *nirK* al gen reportero *lacZ*

Para obtener los plásmidos pMP-Sm_{nor} y pMP-Sm_{nir}, los cuales contenían las fusiones transcripcionales *norECB::lacZ* y *nirK::lacZ*, respectivamente, se amplificaron mediante PCR desde el ADN genómico de GR4 dos regiones de 2056 y 852 pares de bases, utilizando las parejas de cebadores p_{nor}.F/p_{nor}.R y p_{nirK}.F/p_{nirK}.R (Tabla M4), las cuales generaban extremos flanqueantes *EcoRI*. Cada uno de estos fragmentos se clonó primeramente en el vector pCR-XL-TOPO para su secuenciación, y después de subclonó en el vector pMP220 (Spaink *et al.* 1987) digerido con *EcoRI*, eligiendo las construcciones que tenían la orientación correcta con respecto al gen reportero *lacZ*. Como venía siendo habitual, estas construcciones se transfirieron a las cepas de *S. meliloti* por conjugación biparental desde S17.1, seleccionando los transconjugantes en MM con el correspondiente antibiótico.

Anexo 2.2 Listado de los genes diferencialmente expresados obtenidos del transcriptoma de *S. meliloti* GR4 y su derivado *ntrY::Tn5* GRS577.

Tabla A2.1: Listado de genes que se encuentran menos expresados en el transposante GRS577 crecido en MM líquido. Se indica el nombre del gen, una breve descripción del mismo y el valor de M. Los genes están ordenados de acuerdo a su código.

Gen	Descripción	Valor de M
<i>SMa0625</i>	Hypothetical protein	-2,17775211
<i>SMa0630</i>	Conserved hypothetical membrane protein	-1,86014206
<i>SMa0631</i>	Hypothetical protein	-2,50342824
<i>SMa0633</i>	Hypothetical protein	-1,74903888
<i>SMa0682</i>	Decarboxylase (lysine, ornithine, arginine)	-2,29609257
<i>SMa0690</i>	Hypothetical protein	-1,33424971
<i>SMa0693</i>	<i>arcA1</i> ArcA1 arginine deiminase	-2,28690459
<i>SMa0695</i>	<i>arcB</i> ArcB catabolic ornithine carbamoyl transferase	-2,94536428
<i>SMa0697</i>	<i>arcC</i> ArcC carbamate kinase	-2,51579726
<i>SMa0760</i>	<i>fixT2</i> FixT2 anti-kinase protein	-2,63346972
<i>SMa0765</i>	<i>fixN2</i> FixN2 cbb3-type cytochrome c oxidase subunit I.	-2,75185788
<i>SMa0767</i>	<i>fixQ2</i> FixQ2 nitrogen fixation protein	-3,94612090
<i>SMa0769</i>	<i>fixP2</i> FixP2 Diheme c-type cytochrome	-1,92057198
<i>SMa0771</i>	Hypothetical protein	-2,01531041
<i>SMa1007</i>	Copper protein, putative	-1,42548095
<i>SMa1008</i>	Hypothetical protein	-1,22450466
<i>SMa1058</i>	Hypothetical protein	-2,48150929
<i>SMa1086</i>	Conserved hypothetical protein	-3,06874799
<i>SMa1087</i>	Cation transport P-type ATPase	-1,75920168
<i>SMa1089</i>	Hypothetical protein	-1,78500208
<i>SMa1091</i>	Hypothetical protein	-3,06601578
<i>SMa1093</i>	Hypothetical protein	-1,87259663
<i>SMa1096</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,28624053
<i>SMa1100</i>	Hypothetical protein	-2,04684297
<i>SMa1118</i>	<i>hspC2</i> HspC2 heat shock protein. HSP20-like chaperone	-2,12586586
<i>SMa1120</i>	ABC transporter, ATP binding protein,	-3,53064877
<i>SMa1126</i>	Putative protease, transmembrane protein	-3,98978325
<i>SMa1128</i>	<i>degP4</i> DegP4 protease like protein	-2,93147427
<i>SMa1131</i>	Metallo-beta-lactamase superfamily protein	-2,87314881
<i>SMa1147</i>	Conserved hypothetical protein	-3,55750060
<i>SMa1149</i>	Conserved hypothetical protein	-4,10959995
<i>SMa1151</i>	Conserved hypothetical protein	-1,34869231
<i>SMa1153</i>	Hypothetical protein	-2,98260965
<i>SMa1154</i>	Hypothetical protein	-3,10972976
<i>SMa1158</i>	Conserved hypothetical protein	-2,45244493
<i>SMa1160</i>	Hypothetical protein	-1,10023408
<i>SMa1161</i>	Hypothetical protein	-1,56398873
<i>SMa1166</i>	Protein containing an alpha/beta hydrolase fold	-2,56743518
<i>SMa1168</i>	Dehydrogenase, FAD-dependent	-2,04085341
<i>SMa1169</i>	Hypothetical protein	-2,49172701
<i>SMa1170</i>	Conserved hypothetical protein	-2,53380145
<i>SMa1176</i>	Hypothetical protein	-2,69901752
<i>SMa1179</i>	<i>nosR</i> NosR regulatory protein for N2O reductase	-1,97108610
<i>SMa1182</i>	<i>nosZ</i> NosZ N2O reductase	-3,59698780
<i>SMa1183</i>	<i>nosD</i> NosD nitrous oxidase accesory protein. Periplasmic copper-binding precursor	-4,42909926
<i>SMa1184</i>	<i>nosF</i> NosF copper ABC transporter. ATPase	-4,04346557
<i>SMa1185</i>	<i>nosY</i> NosY nitrous oxide metabolic protein. Permease	-3,46755295
<i>SMa1186</i>	<i>nosL</i> NosL protein required for nitrous oxide reduction. Copper chaperone	-3,85322264
<i>SMa1188</i>	<i>nosX</i> NosX protein required for nitrous oxide reduction	-2,35290981
<i>SMa1200</i>	Hypothetical protein	-2,20509841

<i>SMa1201</i>	Hypothetical protein	-2,23117067
<i>SMa1207</i>	Transcriptional regulator, CAP/Crp family	-1,92893786
<i>SMa1208</i>	<i>fixS1</i> FixS1 nitrogen fixation protein (Cytochrome oxidase maturation protein <i>cbb3</i> -type)	-2,51554388
<i>SMa1209</i>	<i>fixI1</i> FixI1 ATPase, P type cation-transporter	-3,30132593
<i>SMa1210</i>	<i>fixH</i> FixH nitrogen fixation protein	-3,45039907
<i>SMa1213</i>	<i>fixP1</i> FixP1 di-heme c-type cytochrome. Cytochrome c oxidase <i>cbb3</i> -type, subunit III	-3,55021304
<i>SMa1214</i>	<i>fixQ1</i> FixQ1 nitrogen fixation protein. <i>cbb3</i> -type cytochrome oxidase, subunit IV	-3,99446905
<i>SMa1216</i>	<i>fixO1</i> FixO1 cytochrome c oxidase, subunit II	-2,61169678
<i>SMa1220</i>	<i>fixN1</i> FixN1 cytochrome c oxidase, subunit I	-3,27290740
<i>SMa1226</i>	<i>fixT1</i> FixT1 antikinase protein. Inhibitor of FixL autophosphorylation	-2,42654998
<i>SMa1231</i>	Conserved hypothetical protein	-3,11208873
<i>SMa1241</i>	<i>napE</i> NapE component of periplasmic nitrate reductase	-1,54037859
<i>SMa1243</i>	<i>azu1</i> Azu1 pseudoazurin (blue copper protein)	-3,76987514
<i>SMa1266</i>	<i>hemN</i> HemN coproporphyrinogen III oxidase	-2,18802177
<i>SMa1279</i>	<i>norE</i> NorE accessory protein for nitric oxide reductase	-1,36853150
<i>SMa1296</i>	<i>adhA1</i> AdhA1 alcohol dehydrogenase, Zn-dependent class III	-2,01646437
<i>SMa1875</i>	Reverse transcriptase	-1,32539777
<i>SMa2115</i>	<i>gst13</i> Gst13 glutathione S-transferase	-2,87758139
<i>SMB20032</i>	Hypothetical protein	-2,67337509
<i>SMB20181</i>	Putative ABC transporter periplasmic solute-binding protein	-1,16107035
<i>SMB20651</i>	Acyl carrier protein-like	-1,03572492
<i>SMB21034</i>	Putative protein	-1,06739712
<i>SMB21273</i>	<i>potD</i> ABC transporter, periplasmic solute-binding protein (putative spermidineputrescine ABC transporter)	-1,04318249
<i>SMc00108</i>	Putative acetyltransferase	-1,51484821
<i>SMc00158</i>	Hypothetical protein	-1,84618762
<i>SMc00159</i>	Conserved hypothetical signal peptide protein	-2,15907519
<i>SMc00610</i>	Putative hydrolase	-1,43751608
<i>SMc00665</i>	Hypothetical protein	-1,69490012
<i>SMc00765</i>	<i>mcpZ</i> Probable methyl-accepting chemotaxis protein	-1,81290178
<i>SMc00849</i>	Hypothetical protein	-1,02828934
<i>SMc00925</i>	Conserved hypothetical protein, signal peptide	-1,16517019
<i>SMc00975</i>	<i>mcpU</i> Chemoreceptor methyl-accepting chemotaxis transmembrane protein	-2,93787462
<i>SMc00987</i>	Conserved hypothetical protein	-1,65043745
<i>SMc00998</i>	Conserved hypothetical signal peptide protein	-1,05670387
<i>SMc01045</i>	<i>ntrX</i> Probable nitrogen regulation protein	-2,74843512
<i>SMc01104</i>	<i>mcpX</i> Probable chemoreceptor methyl-accepting chemotaxis transmembrane protein	-2,20165178
<i>SMc01169</i>	<i>ald</i> Probable alanine dehydrogenase oxidoreductase	-2,59646025
<i>SMc01191</i>	Hypothetical/unknown protein	-1,03047964
<i>SMc01329</i>	<i>azoR</i> Probable FMN-dependent NADH-azoreductase	-1,73245981
<i>SMc01468</i>	<i>cheW2</i> Probable chemotaxis protein	-1,68993942
<i>SMc02217</i>	<i>metZ</i> Probable O-succinylhomoserine sulfhydrylase	-1,57269947
<i>SMc02433</i>	<i>clpB</i> Probable ATP-dependent protease (heat shock protein)	-1,29497199
<i>SMc02562</i>	<i>pckA</i> Phosphoenolpyruvate carboxykinase	-1,35219434
<i>SMc02761</i>	<i>trxA</i> Probable thioredoxin protein	-1,52015267
<i>SMc03004</i>	<i>icpA/mcpE</i> IcpA/McpE internal chemotaxis protein	-1,77540463
<i>SMc03005</i>	Conserved hypothetical protein	-1,46458447
<i>SMc03006</i>	<i>cheY1</i> Chemotaxis regulator protein	-1,99352920
<i>SMc03007</i>	<i>cheA</i> Chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)K07...	-2,26161412
<i>SMc03008</i>	<i>cheW1</i> CheW-like protein	-2,03857014
<i>SMc03009</i>	<i>cheR</i> Chemotaxis protein methyltransferase	-1,71831344
<i>SMc03010</i>	<i>cheB</i> Chemotaxis response regulator protein-glutamate methyltransferase	-2,63597542
<i>SMc03011</i>	<i>cheY2</i> Chemotaxis regulator protein	-1,25416260
<i>SMc03012</i>	<i>cheD</i> Probable chemotaxis protein	-2,02940340
<i>SMc03013</i>	Conserved hypothetical protein	-1,75834195
<i>SMc03014</i>	<i>fliF</i> Flagellar M-ring transmembrane protein	-2,32291906
<i>SMc03015</i>	<i>visN</i> Transcriptional regulator of motility genes, LuxR family	-1,10734699
<i>SMc03017</i>	Conserved hypothetical protein	-1,13924385
<i>SMc03019</i>	<i>fliG</i> Flagellar motor switch protein	-2,17885658

<i>SMc03020</i>	<i>fliN</i> Flagellar motor switch protein	-2,20755005
<i>SMc03023</i>	Conserved hypothetical protein	-1,52508929
<i>SMc03027</i>	<i>flgB</i> Flagellar basal-body rod protein	-2,30057069
<i>SMc03028</i>	<i>flgC</i> Flagellar basal-body rod protein	-2,16716135
<i>SMc03029</i>	<i>fliE</i> Flagellar hook-basal body complex protein	-2,02486691
<i>SMc03031</i>	<i>flgA</i> Flagellar precursor transmembrane protein	-1,20490298
<i>SMc03032</i>	<i>flgI</i> Flagellar P-ring precursor transmembrane protein	-1,12212126
<i>SMc03034</i>	<i>flgH</i> Flagellar L-ring protein precursor	-1,63186898
<i>SMc03037</i>	<i>flaA</i> Flagellin A	-2,49878614
<i>SMc03038</i>	<i>flaB</i> Flagellin B	-2,65290630
<i>SMc03039</i>	<i>flaD</i> Flagellin D	-1,96375716
<i>SMc03040</i>	<i>flaC</i> Flagellin C	-2,52203666
<i>SMc03041</i>	Hypothetical protein	-1,35075453
<i>SMc03046</i>	<i>rem</i> Response regulator of exponential growth motility	-2,07805561
<i>SMc03047</i>	<i>flgE</i> Flagellar hook protein	-2,37372997
<i>SMc03049</i>	<i>flgL</i> Putative flagellar hook-associated protein	-2,76332449
<i>SMc03050</i>	<i>flaF</i> Putative flagellin synthesis regulator	-2,03304068
<i>SMc03051</i>	<i>flbT</i> Putative flagellin synthesis repressor protein	-1,70295495
<i>SMc03052</i>	<i>flgD</i> Putative basal-body rod modification protein	-2,05652119
<i>SMc03057</i>	Hypothetical transmembrane protein	-1,48391362
<i>SMc03071</i>	Hypothetical protein	-1,82291040
<i>SMc03090</i>	<i>cheW3</i> Putative chemotaxis protein	-1,86191137
<i>SMc03138</i>	Sugar kinase	-1,16217124
<i>SMc03254</i>	<i>fixT3</i> Putative antikinase	-2,77882972
<i>SMc03797</i>	<i>metA</i> Probable homoserine O-succinyltransferase	-1,13294026
<i>SMc03799</i>	Conserved hypothetical protein	-3,54026312
<i>SMc03983</i>	<i>fbaB</i> Probable fructose-bisphosphate aldolase class I	-1,03492641
<i>SMc04040</i>	<i>ibpA</i> Probable heat shock protein. Molecular chaperone	-1,30716077
<i>SMc04059</i>	Conserved hypothetical protein, signal peptide	-2,08718613
<i>SMc04244</i>	<i>znuC</i> Probable high-affinity zinc uptake system ABC transporter	-1,38143553
<i>SMc04245</i>	<i>znuA</i> Probable high-affinity zinc uptake system ABC transporter	-1,22395962
<i>SMc04257</i>	Putative gentiobiose, salicin, and cellobiose ABC transporter, permease component	-1,53472548
<i>SMc04258</i>	Putative gentiobiose, salicin, and cellobiose ABC transporter, permease component	-1,47894314
<i>SMc04318</i>	<i>cspA1</i> Cold shock transcriptional regulator	-1,53389423
<i>SMc04319</i>	Putative cold shock protein	-1,63692541

Tabla A2.2: Listado de genes que se encuentran más expresados en el transposante GRS577 crecido en MM líquido. Se indica el nombre del gen, una breve descripción del mismo y el valor de M. Los genes están ordenados de acuerdo a su código.

Gen	Descripción	Valor de M
<i>nptII</i>	<i>nptII</i> Neomycin phosphotransferase II	5,01874935
<i>SMa0185</i>	Conserved hypothetical protein. Putative transmembrane-transport protein, MFS protein	1,08113698
<i>SMa0723</i>	Conserved hypothetical membrane protein	1,18250677
<i>SMa1065</i>	Hypothetical protein	1,51556186
<i>SMa1495</i>	Putative serine-pyruvate transaminase (aminotransferase)	1,24085813
<i>SMa1623</i>	Transposase, fragment	1,05880245
<i>SMa1683</i>	Arylsulfatase	1,08815198
<i>SMa1705</i>	Transcriptional regulator, MucR family	1,44433190
<i>SMa1750</i>	Hypothetical protein	1,36810270
<i>SMa1770</i>	Hypothetical protein	1,33380739
<i>SMa2294</i>	<i>mrcA2</i> MrcA2 penicillin-binding protein	1,10891732
<i>SMa2295</i>	Penicillin-binding protein, dimerisation domain	1,22477331
<i>SMb20104</i>	Hypothetical membrane protein	2,04089492
<i>SMb20195</i>	<i>ppe</i> Ribulose-phosphate 3-epimerase	1,17849333
<i>SMb20196</i>	<i>cbbX</i> ATPase of the AAA+ class.	1,28576541
<i>SMb20197</i>	<i>cbbS</i> Putative ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit	1,21835625

	protein	
<i>SMB20198</i>	<i>cbbL</i> Putative ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase large subunit protein	1,58726808
<i>SMB20199</i>	<i>cbbA</i> Putative fructose-1,6-bisphosphate aldolase class II protein	1,61013663
<i>SMB20200</i>	<i>cbbT</i> Putative transketolase protein	1,38352221
<i>SMB20201</i>	<i>cbbP</i> Putative phosphoribulokinase protein	2,38983967
<i>SMB20202</i>	<i>cbbF</i> Putative D-fructose-1,6-bisphosphatase protein	1,31583878
<i>SMB20204</i>	<i>pqqA</i> Putative pyrroloquinoline quinone (PQQ) synthesis protein A	1,09000079
<i>SMB20361</i>	Putative ionic voltage-gated channel protein	1,71119528
<i>SMB20488</i>	Putative isomerase	1,00131470
<i>SMB20661</i>	Putative sugar uptake ABC transporter ATP-binding protein	1,36604887
<i>SMB20754</i>	Conserved hypothetical protein	1,18859349
<i>SMB20767</i>	<i>dak</i> Putative dihydroxyacetone (glycerone) kinase protein	1,45383251
<i>SMB20838</i>	Secreted calcium-binding protein	1,02759873
<i>SMB20943</i>	<i>exoZ</i> Acetyltransferase protein	1,74389037
<i>SMB20944</i>	<i>exoQ</i> Putative polysaccharide polymerase	1,09181033
<i>SMB20946</i>	<i>exoY</i> Exopolysaccharide production protein, probable sugar transferase involved in lipopolysaccharide synthesis, regulated by ExoR	2,06612232
<i>SMB20948</i>	<i>exoU</i> Glucosyltransferase protein	1,55424150
<i>SMB20949</i>	<i>exoV</i> Pyruvyltransferase protein	1,00339775
<i>SMB20954</i>	<i>exoH</i> Succinyltransferase protein	2,04859486
<i>SMB20955</i>	<i>exoK</i> Endo-beta-1,3-1,4-glycanase protein (licheninase)	2,15654397
<i>SMB20959</i>	<i>exoO</i> Glucosyltransferase protein	1,39671051
<i>SMB20960</i>	<i>exoN</i> UDPglucose pyrophosphorylase protein	2,74551385
<i>SMB20961</i>	<i>exoP</i> Protein tyrosine kinase, MPA1 family, involved in succinoglycan chain-length determination	1,10957656
<i>SMB21091</i>	<i>lysM</i> Cell-wall lytic enzyme (lysozyme), similar to muramidase protein	1,03369886
<i>SMB21314</i>	<i>wgeA</i> RTX toxins and related Ca ²⁺ -binding proteins	1,13515337
<i>SMB21337</i>	Carbon-monoxide dehydrogenase (acceptor)	1,57796893
<i>SMB21440</i>	Hypothetical protein	3,13083001
<i>SMB21441</i>	Conserved hypothetical protein (Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase protein)	1,36323415
<i>SMB21454</i>	Hypothetical protein	2,03040664
<i>SMB21467</i>	Hypothetical protein	1,79012084
<i>SMB21600</i>	<i>ampC</i> Putative exported beta-lactamase protein	1,06737800
<i>SMB21670</i>	<i>tauX</i> Putative taurine dehydrogenase small subunit	1,09110097
<i>SMB21690</i>	<i>exoW</i> Glucosyltransferase protein	1,65307013
<i>SMc00062</i>	Hypothetical protein	2,50101570
<i>SMc00070</i>	Hypothetical protein	1,17913801
<i>SMc00096</i>	Hypothetical protein	1,23278081
<i>SMc00404</i>	Hypothetical protein	2,00805986
<i>SMc00408</i>	<i>uppP</i> Putative undecaprenyl-diphosphatase	1,07498597
<i>SMc00604</i>	<i>ropB1</i> Probable outer membrane protein (porine)	1,39053583
<i>SMc00741</i>	<i>acsA3</i> Putative fatty-acid-CoA ligase protein	1,14516181
<i>SMc00743</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,17803691
<i>SMc00764</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,13927530
<i>SMc00929</i>	Putative transcriptional regulator	1,45432561
<i>SMc00940</i>	Hypothetical protein	2,48083771
<i>SMc01003</i>	Conserved hypothetical protein	1,00735289
<i>SMc01016</i>	Hypothetical protein	1,53815079
<i>SMc01026</i>	Hypothetical/unknown protein	1,29244740
<i>SMc01044</i>	<i>ntrY</i> Probable nitrogen regulation transmembrane protein	2,45525476
<i>SMc01187</i>	<i>rlpA</i> Putative rare lipoprotein A precursor	1,45592529
<i>SMc01266</i>	Conserved hypothetical protein	1,00530938
<i>SMc01556</i>	Conserved hypothetical protein	1,09545976
<i>SMc01560</i>	Conserved hypothetical protein	1,23439899
<i>SMc01580</i>	Hypothetical transmembrane protein	2,49900118
<i>SMc01668</i>	Putative transcriptional regulator	1,61975551
<i>SMc01774</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,36089178
<i>SMc01855</i>	Putative membrane-bound lytic transglycosylase, signal peptide	2,14588983
<i>SMc01862</i>	<i>murF</i> Probable UDP-N-acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelate--D-alanyl-D-alanine ligase	1,24621128
<i>SMc01874</i>	<i>ftsZ1</i> Cell division protein	1,22361398

<i>SMc02160</i>	Probable permease (ABC transporter)	1,00776716
<i>SMc02170</i>	<i>frcC</i> Putative fructose ABC-type transport system, permease component	1,35062593
<i>SMc02242</i>	Hypothetical transmembrane protein	1,93540636
<i>SMc02317</i>	Hypothetical signal peptide protein	1,15861932
<i>SMc02467</i>	<i>msrA2</i> Probable peptide methionine sulfoxide reductase MsrA 2	1,72956029
<i>SMc02560</i>	<i>chvI</i> Transcriptional regulatory protein	1,14984881
<i>SMc02727</i>	Hypothetical protein	1,63984188
<i>SMc02940</i>	<i>tilS</i> Putative tRNA(Ile)-lysidine synthase	1,24863219
<i>SMc03153</i>	<i>eda2</i> Probable KHG/KDPG aldolase (includes: 4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase, 2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase)	1,07327063
<i>SMc03832</i>	Conserved hypothetical signal peptide protein	1,22588989
<i>SMc03847</i>	<i>ccmA</i> Putative heme exporter A (cytochrome C-type biogenesis ATP-binding protein) ABC transporter	1,57403707
<i>SMc03924</i>	<i>glgA 1</i> Probable glycogen synthase (starch [bacterial glycogen] synthase)	1,02569268
<i>SMc04135</i>	Putative amino acid or peptide ABC transporter	1,31903696
<i>SMc04141</i>	<i>gst9</i> Putative glutathione S-transferase	1,18232301
<i>SMc04236</i>	Putative glycine-rich cell wall structural transmembrane protein	2,58106393

CAPÍTULO 3

**Identificación y caracterización de
genes de *Sinorhizobium meliloti*
regulados por 2-Tridecanona**

3. Identificación y caracterización de genes de *Sinorhizobium meliloti* regulados por 2-Tridecanona.

3.1. Identificación de genes de *S. meliloti* GR4 inducidos o reprimidos en respuesta a 2-TDC.

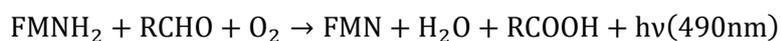
Al comienzo de esta tesis se habían iniciado una serie de investigaciones en el grupo de la Dra. Soto conducentes a identificar genes de *S. meliloti* diferencialmente expresados en respuesta a 2-TDC. Con estos estudios se pretendía tener una visión global del efecto en regulación génica ejercido por la MK, para así poder inferir su mecanismo de acción. Análisis transcriptómicos empleando la tecnología de *microarrays* realizados con la cepa Rm1021 crecida en diferentes condiciones de cultivo determinaron que dicho efecto en regulación prácticamente se da sólo cuando las células crecen en medio semisólido, ya que apenas se identificaron genes diferencialmente expresados en presencia de 2-TDC en células crecidas en líquido (Bernabéu-Roda 2014). Desgraciadamente, más allá de esto la información que se pudo obtener de estos análisis fue insuficiente para establecer un mecanismo molecular de actuación. Muchos de los genes inducidos por la MK tenían algún tipo de relación con mecanismos de resistencia a compuestos tóxicos o con fenómenos de oxidorreducción. También destacó la reducción en la actividad transcripcional de genes relacionados con la captación y metabolismo del hierro, incluyendo los genes necesarios para la síntesis del sideróforo rhizobactina 1021, un sideróforo particular con actividad surfactante, clave en el desplazamiento en superficie de la cepa Rm1021. Estos datos sugerían que la 2-TDC podría generar algún tipo de estrés celular en *S. meliloti*. Sin embargo, no se identificaron genes que pudieran explicar más directamente los fenotipos que muestra esta bacteria en presencia de la 2-TDC.

Aunque los análisis de expresión global mediante *microarrays* suponen una potente herramienta con la que se obtiene información a gran escala sobre procesos biológicos, también presentan ciertas limitaciones. La más evidente es que no sirven para estudiar procesos regulados postranscripcionalmente. Además, al estar basados en fenómenos de hibridación en muchas ocasiones se obtienen resultados poco precisos y muy variables debido a eventos de hibridación inespecífica. Y también al contrario, se puede perder información si ciertos genes no están representados en el *microarray* (Zhao *et al.* 2014).

Por ello, como herramienta complementaria al análisis transcriptómico, decidimos utilizar una aproximación genética basada en la tecnología de las trampas génicas.

Esta metodología consiste en emplear elementos de inserción que portan uno o varios genes reporteros carentes de promotor; de esta forma, si los reporteros se insertan en una zona adecuada, es posible medir la actividad de cualquier promotor celular y además poder discernir cuál es la función del gen observando el patrón de actividad de su promotor (Bellen 1999; Casadaban & Cohen 1979). Mediante esta aproximación, pretendíamos identificar y caracterizar de forma más específica genes cuya expresión se viese alterada en respuesta a 2-TDC. Además de suponer una herramienta adicional para estudiar el mecanismo de acción de la 2-TDC, otra ventaja de esta estrategia es que nos permitía emplear nuestra cepa de estudio GR4 sin correr el riesgo de perder información; no hay que olvidar que los *microarrays* de *S. meliloti* están basados en la cepa Rm1021 y existen diferencias importantes a nivel genómico entre ambas (Martínez-Abarca *et al.* 2013; Rüberg *et al.* 2003; Galibert *et al.* 2001).

Como elemento de inserción empleamos el transposón mini-Tn5 *luxCDABE* (en adelante Tn5*lux*), que contiene un gen de resistencia a kanamicina como elemento de selección y lleva incorporado el operón *lux* de la bacteria *Photobacterium luminescens* como secuencia reportera (Winson *et al.* 1998). Dicho operón está constituido por los genes *luxAB*, codificantes de las dos subunidades que conforman la enzima luciferasa, y *luxCDE* que codifican el complejo de la ácido graso reductasa encargada de sintetizar el aldehído que actúa como sustrato de la enzima. La reacción catalizada por la luciferasa, y en la que se emite luz en el espectro del azul-verde, es la siguiente:



Como vemos, todos los componentes de la reacción son metabolitos que se encuentran en la célula, con lo que no se requiere la adición de ningún sustrato especial, de forma que se puede medir la expresión génica en tiempo real sin usar ningún método destructivo o invasivo. La detección con reporteros bioluminiscentes ofrece las ventajas adicionales de ser un método muy sensible que no está interferido por ruido de fondo, ya que la bioluminiscencia es un fenotipo restringido a unos pocos grupos de bacterias (Winson *et al.* 1998; Casadaban & Cohen 1979).

De forma similar a como se hizo en el Capítulo 2, la cepa GR4 fue sometida a una mutagénesis generalizada con el Tn5*lux* y las colonias candidatas para el escrutinio fueron seleccionadas creciendo la mutateca en placas de MM suplementado con Km. Cada colonia se sembró en picadura en dos placas de MM sólido (1,3% agar), las cuales se incubaron 20-24 horas a 30 °C. Posteriormente en la tapa de una de las placas se adicionó 1 µmol de 2-TDC en su forma volátil, y en la otra etanol como control, siguiendo el procedimiento habitual de preparación e inoculación de los

tratamientos. Tras 20-24 horas de incubación con dichos tratamientos cada pareja de placas se visualizó mediante una cámara luminométrica. Aquellas colonias crecidas en presencia de 2-TDC que tras tres pases en picadura mostraron una intensidad lumínica claramente diferenciada de su correspondiente colonia control, se seleccionaron para la subsiguiente caracterización genética (Figura 3.1).

GR4::Tn5luxCDABE

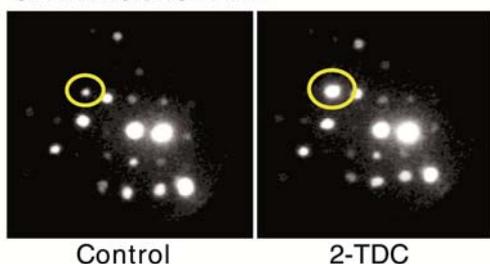


Figura 3.1: Visualización de cepas GR4::Tn5lux mediante detección lumínica: Se muestra una fotografía ilustrativa de la inducción de luminiscencia causada por la 2-TDC en colonias crecidas en picadura en MM.

De los 6268 transposantes analizados, se obtuvieron tres que presentaban diferencias claras *de visu* en la luminiscencia entre el control y la 2-TDC. En los tres casos la emisión de luz fue mayor en presencia de la MK, con lo que se denominaron con el código GTR (del inglés, *GR4 2-Tridecanone Responsive*): GTR3033, GTR13136 y GTR15852.

Tras la valoración cualitativa decidimos realizar un análisis cuantitativo para verificar y medir de forma más exacta esa inducción en la bioluminiscencia en presencia de 2-TDC. Esta vez, en lugar de resembrar en picadura, decidimos partir de cultivos líquidos frescos en medio rico TY crecidos desde glicerol, sembrando gotas de 10 μ l en el centro de las placas de MM (1,3% agar). El procedimiento para incubar y aplicar los tratamientos fue el mismo empleado para el escrutinio. Finalmente las células de los *spots* se recogieron en MM líquido, se ajustó la DO_{600nm} a 1 y con esta suspensión final se inocularon placas de 96 pocillos para medir la luminiscencia en un lector de placas TECAN.

Además de los tres transposantes de interés se midió la luminiscencia de un transposante control, GR4luxC, el cual no había mostrado diferencias durante los ensayos en picadura. Como vemos en la Figura 3.2, los tres mutantes emitían mayor bioluminiscencia en presencia de 2-TDC, mientras que la del transposante control no varió entre los tratamientos. Para GTR13136 y GTR15852 el nivel de inducción con respecto a etanol fue similar, 1,9 y 2,0 veces, respectivamente. En cambio, la luminiscencia en GTR3033 fue 32 veces superior con 2-TDC que con etanol.

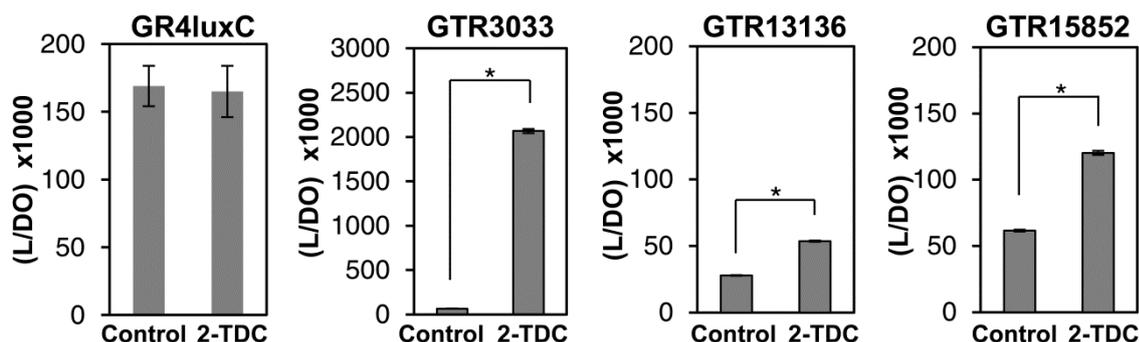


Figura 3.2: Análisis cuantitativo de la intensidad lumínica de transposantes GTR derivados de GR4. Bioluminiscencia de células de los transposantes GTR3033, GTR13136, GTR15852 y el transposante control GR4luxC, recogidas desde placas de MM sólido e incubadas durante 24 horas en presencia de 1 μ mol de 2-TDC o etanol como control. Los gráficos representan la intensidad lumínica en relación a la absorbancia a 600 nm (L/DO). Las barras de error representan el error estándar de la media, calculado a partir de dos experimentos independientes. Los asteriscos indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$).

3.2. Caracterización genética de los transposantes que responden a 2-TDC.

En esta ocasión, aunque se hicieron varios intentos, no fue posible determinar el sitio de inserción del *Tn5lux* mediante PCR arbitraria y posterior secuenciación. De forma alternativa optamos por clonar en un plásmido un fragmento de ADN genómico de cada uno de los transposantes, conteniendo una parte de la construcción mini-*Tn5luxCDABE* que incluía el gen de resistencia a Km. Posteriormente se secuenciaron las regiones adyacentes a las secuencias del transposón. Esta estrategia se explica con más detalle en la sección de Anexo 3.1.

Los transposantes GTR13136 y GTR15852, resultaron estar afectados en el mismo gen, el homólogo a *smb20342* localizado en el plásmido simbiótico pSymB. En el primero, el *Tn5lux* estaba situado entre los codones para los aa₃₅₈-aa₃₅₉, y en el segundo el transposón estaba interrumpiendo el codón para el aa₆₇₈ (Figura 3.3a). Este gen codifica la subunidad beta de 737 aa de una teórica isoquinolina 1-oxidoreductasa (Ior). La subunidad alfa estaría codificada por el gen *smb20343* situado aguas arriba del anterior y probablemente formando operón con él (Schlüter *et al.* 2013). La isoquinolina es un alcaloide natural formado por un anillo bencénico y una piridina. En bacterias capaces de metabolizar dicho alcaloide el complejo heterodimérico de la oxidoreductasa lo transforma en 1-oxo-1,2-dihidroisoquinolina, con la consiguiente reducción de un compuesto aceptor (Lehmann *et al.* 1995).

Interesantemente, tanto *smb20342* como *smb20343* también aparecieron inducidos en el transcriptoma de la cepa Rm1021 en respuesta a 2-TDC.

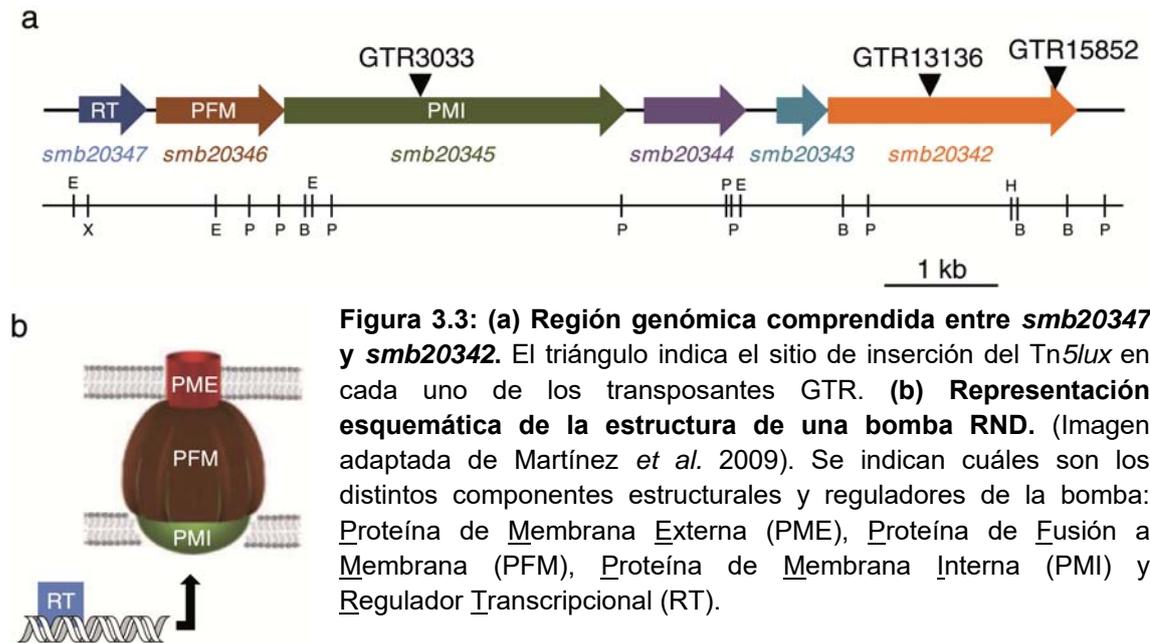


Figura 3.3: (a) Región genómica comprendida entre *smb20347* y *smb20342*. El triángulo indica el sitio de inserción del *Tn5lux* en cada uno de los transposantes GTR. **(b) Representación esquemática de la estructura de una bomba RND.** (Imagen adaptada de Martínez *et al.* 2009). Se indican cuáles son los distintos componentes estructurales y reguladores de la bomba: Proteína de Membrana Externa (PME), Proteína de Fusión a Membrana (PFM), Proteína de Membrana Interna (PMI) y Regulador Transcripcional (RT).

Curiosamente, en la cepa GTR3033 el *Tn5lux* se situó interrumpiendo el codón para el aa₄₀₄ del gen homólogo a *smb20345*, muy cercano al gen mutado en los otros dos transposantes (Figura 3.3a). Este gen codifica una proteína de 1049 aa anotada como teórica proteína de resistencia a acriflavina. Se trata de una proteína de membrana con homología a las bombas de extrusión de la familia RND (del inglés, *Resistance, Nodulation, Cell Division*). Este tipo de bombas está constituido por un complejo multimérico de tres elementos básicos (Figura 3.3b): el transportador propiamente dicho, que se encuentra embebido en la membrana interna, una proteína periplásmica también denominada proteína de fusión, y que une el transportador con el tercer componente de la bomba, un canal o porina situada en la membrana externa (Blair & Piddock 2009). Los genes *smb20345* y *smb20346* codificarían los dos primeros componentes de la bomba, siendo el primero la proteína de membrana interna y el segundo la proteína de fusión periplásmica; presumiblemente el complejo tripartito se completaría con la proteína de membrana externa TolC (*smc02082*), que es la única anotada como tal en todo el genoma de *S. meliloti*. La organización estructural y transcripcional de este tipo de bombas suele estar muy conservada y estrechamente regulada por diversos tipos de factores transcripcionales, situados junto a los genes estructurales (Martínez *et al.* 2009). En el caso de la región genómica de *smb20345* encontramos un gen que codifica un posible regulador transcripcional de la familia TetR, *smb20347*. Este gen, aguas arriba de *smb20346*, se transcribe en la misma

dirección que los otros dos y teóricamente forma operón con ellos (Schlüter *et al.* 2013). Precisamente *smb20347* se encontró en el grupo de genes inducidos por la 2-TDC en el transcriptoma de Rm1021 (Bernabéu-Roda 2014).

Dada la inducción tan alta que muestra el transposante GTR3033, junto con la idea de que la bomba afectada en el mismo pudiese estar relacionada con el reconocimiento y transporte de 2-TDC, decidimos centrarnos en esta cepa a la hora de abordar la caracterización fenotípica.

3.3. Caracterización fenotípica del transposante GTR3033.

3.3.1. Crecimiento y movilidad

Para descartar de entrada que cualquier alteración fenotípica fuese consecuencia de diferencias en crecimiento con respecto a GR4, medimos las curvas de crecimiento en ambas cepas crecidas en diferentes medios de cultivo, tanto medio rico TY como medio definido MM.

En primer lugar, algo muy llamativo que comenzamos a observar desde los primeros análisis de luminiscencia con células crecidas desde glicerol, es que el transposante GTR3033 crecía sistemáticamente a menor ritmo que la cepa silvestre cuando se inoculaba directamente desde el vial del glicerol al medio de crecimiento. En cambio, si se partía de un cultivo fresco en placa inoculando una pequeña masa celular, las dos cepas alcanzaban el mismo grado de turbidez. Por lo tanto, siempre que hubiese que establecer un cultivo líquido con la cepa GTR3033 se decidió inocular todas las cepas a ensayar desde una placa fresca sacada del glicerol y no desde el glicerol directamente.

Así se procedió para las curvas de crecimiento, y como vemos en las Figuras 3.4a y 3.4b ni en medio TY ni en medio MM se observaron diferencias en absorbancia entre GR4 y su derivado *Tn5lux*.

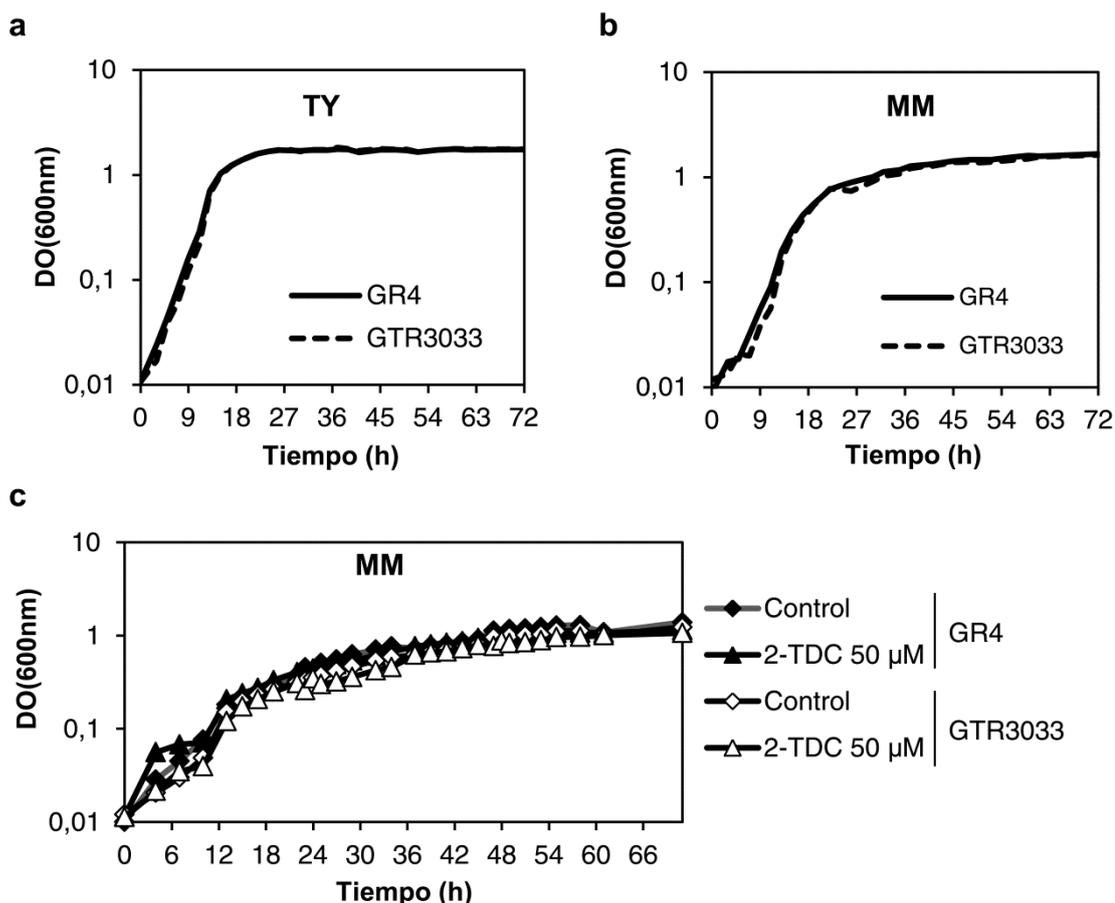


Figura 3.4: Curvas de crecimiento de *S. meliloti* GR4 y su derivado GTR3033. Las cepas se crecieron en cultivos líquidos de (a) medio rico TY, (b) MM, o (c) MM suplementado con 50 μM de 2-TDC (o etanol como control). Se muestra un ensayo representativo de al menos dos realizados.

Cuando se analizó el crecimiento en respuesta a 2-TDC el resultado fue el mismo. La MK no alteró el crecimiento mostrado por GTR3033 en MM con etanol y prácticamente los valores de absorbancia se mantuvieron iguales a los de GR4 en las mismas condiciones.

Una vez comprobado que la inserción del *Tn5lux* en la bomba no afectaba al crecimiento de *S. meliloti*, nos propusimos llevar a cabo ensayos de movilidad con la cepa GTR3033. Se realizaron tanto ensayos de movilidad en superficie en presencia y ausencia de 2-TDC como ensayos *swimming*.

El transposante no mostró diferencias en movilidad en superficie (Figuras 3.5a y 3.5b) y tampoco movilidad *swimming* (Figura 3.5c) con respecto a la cepa silvestre GR4. En cuanto a su respuesta a 2-TDC, se comprobó que en las primeras 24 horas apenas aumentaba su halo de expansión con respecto a las condiciones control, incluso con menor porcentaje de agar. En las siguientes 24 horas el nivel de respuesta casi se igualó con el de GR4 en MM_{AN} (0,6% agar); sin embargo, con 1% de agar, el

incremento del desplazamiento experimentado por GR4 es mucho mayor que el del transposante. Por lo tanto, aunque responde ligeramente a la MK, en comparación a GR4 se puede decir que GTR3033 está afectado en este fenotipo.

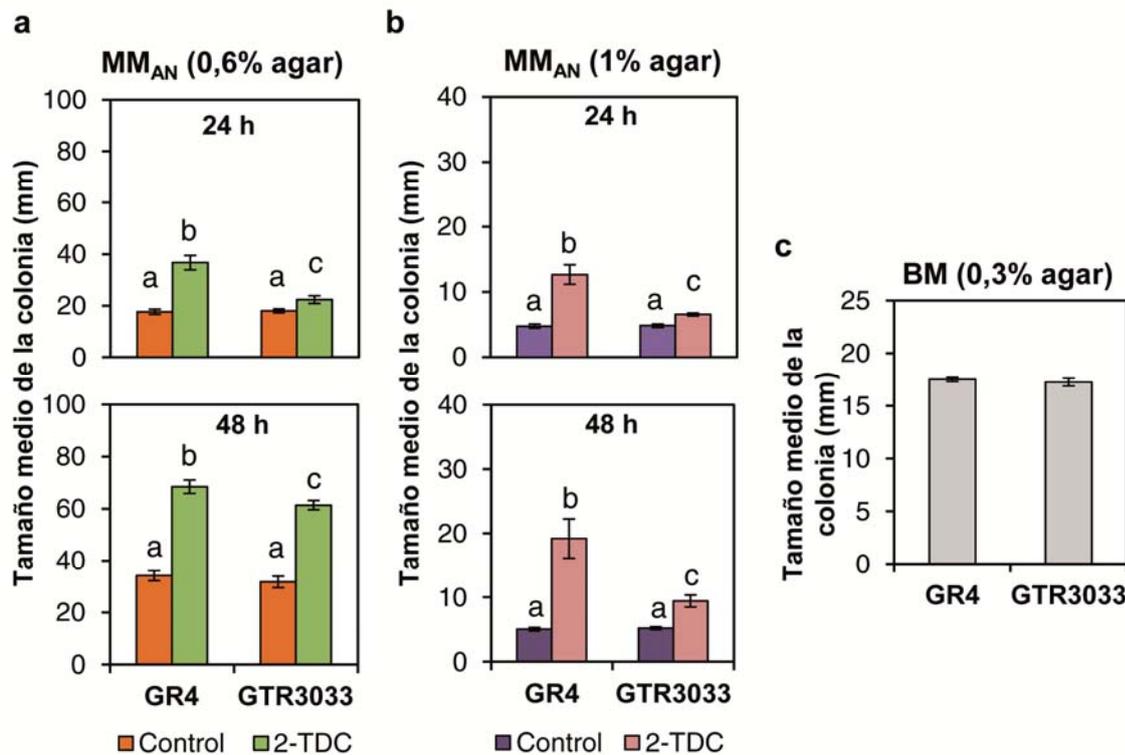


Figura 3.5: Fenotipo en movilidad de *S. meliloti* GR4 y su derivado GTR3033. Los gráficos muestran la movilidad en superficie media (en mm) en ausencia/presencia de 2-TDC de estas cepas crecidas durante 24 y 48 horas en MM_{AN} con (a) 0,6% de agar o (b) 1% de agar. Para los tratamientos se aplicó en la tapa de la placa 1 μ mol de la MK o etanol como control. (c) Ensayo de movilidad *swimming*. Se muestra el diámetro de la colonia (en mm) tras 72 horas de incubación. Las barras de error representan el error estándar de la media calculado a partir de al menos doce medidas tomadas de dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas (test ANOVA, $P \leq 0.05$) se señalan con distintas letras.

3.3.2. Identificación del promotor activado por 2-TDC

En el clúster de genes *smb20347-smb20346-smb20345* se han identificado hasta dos sitios de inicio de la transcripción, ambos aguas arriba del gen *smb20347* (Schlüter *et al.* 2013). Esto señala que ahí se encuentra la región promotora que dirige la transcripción del operón codificante de la teórica bomba RND, y que se activa en el transposante GTR3033 por acción de la 2-TDC. Para corroborar esto experimentalmente y comparar la actividad de este promotor entre los fondos mutante y silvestre, se construyeron fusiones traducionales de las regiones aguas arriba de

smb20346 y *smb20347* al gen reportero fluorescente *mCherry*, y transferimos dichas fusiones tanto a GR4 como a GTR3033 para medir la fluorescencia (ver más detalles en Anexo 3.2).

Decidimos realizar los ensayos aplicando la 2-TDC como volátil, con lo que las cepas se crecieron sobre placas y se recogieron posteriormente las células para medir la fluorescencia. El procedimiento elegido en este caso no fue la siembra en gota en MM_{AP} (1,3%), como se hizo tras el escrutinio de los mutantes GR4::Tn5*lux* (apartado 3.1), sino que se siguió el protocolo para los ensayos *swarming*, utilizando MM_{AN} al 1% de agar.

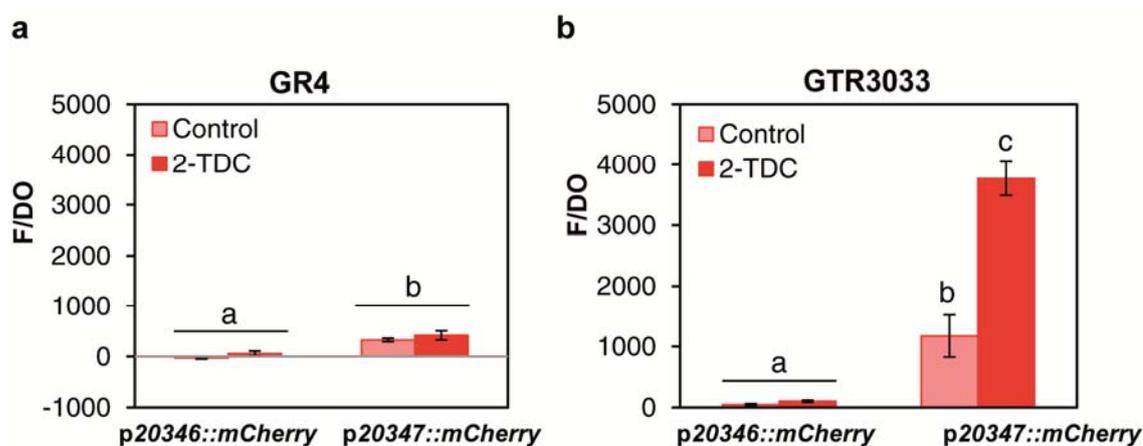


Figura 3.6: Análisis de expresión génica en *S. meliloti* GR4 y GTR3033 mediante fusiones traduccionales. Las regiones aguas arriba de las secuencias codificantes de *smb20346* y *smb20347* se fusionaron al gen reportero *mCherry* (p20346 y p20347::mCherry, respectivamente), y se midió la fluorescencia emitida por las mismas en los fondos silvestre (a) y mutante (b). Las mediciones se hicieron a partir de células crecidas durante 24 horas en placas de MM_{AN} (1% agar) en presencia de 2-TDC (1 μ mol aplicado en la tapa) o etanol como control. Los gráficos muestran la intensidad de fluorescencia en relación a la DO de la suspensión bacteriana (F/DO). Se muestran los valores finales de F/DO tras haber sustraído la fluorescencia emitida por las mismas cepas conteniendo un plásmido control con *mCherry* sin promotor. Las barras de error indican el error estándar de la media obtenido a partir de al menos doce medidas en dos experimentos independientes. Las diferencias significativas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0.05$) se indican con diferentes letras.

Como vemos en las Figuras 3.6a y 3.6b, la región aguas arriba de *smb20346* no mostró actividad alguna en ninguno de los fondos genéticos y con ninguno de los tratamientos. En cambio, la región aguas arriba de *smb20347* y que según hemos mencionado anteriormente albergaría el promotor de la bomba, sí tiene cierta actividad en las condiciones control, ya que permite cierta expresión de *mCherry*. Curiosamente, en el transposante esta expresión es mayor que en la cepa silvestre GR4, y además en ésta última la presencia de 2-TDC no incrementa la fluorescencia como sí lo hace

en GTR3033. Por lo tanto, la activación de la expresión de la bomba por efecto de la 2-TDC es consecuencia de la mutación de la misma. Esto sugiere que la interrupción en el transporte y por tanto la acumulación del teórico sustrato, ya sea 2-TDC o un compuesto producido por efecto de la MK, está generando un *feedback* positivo en la transcripción del operón. En cambio, en la cepa silvestre en la que el flujo no está interrumpido, en las condiciones estudiadas dicha acumulación no se produciría y por tanto no hay una inducción observable. La fluorescencia emitida por la fusión *p20347::mCherry* en el transposante en condición control sugiere que este sustrato puede ser producido por la bacteria de forma natural.

Además de la fusión a *mCherry*, una vez identificada la región promotora de *smb20347* como la inducida en el mutante por acción de la 2-TDC, decidimos fusionarla también al gen reportero *lacZ*, para contar con más variedad de herramientas a la hora de estudiar la expresión de la bomba en distintas condiciones. Los detalles sobre la construcción de esta fusión se recogen en Anexo 3.2.

3.3.3. Mutagénesis dirigida sobre *smb20345* y complementación

Antes de continuar caracterizando funcionalmente la bomba RND y los fenotipos del transposante GTR3033, se reconstruyó la mutación del gen *smb20345* en *S. melloti* GR4 mediante inserción dirigida del plásmido *pK18mob* en una zona cercana al sitio de inserción del *Tn5lux* del transposante. Con esto se pretendía descartar que otra mutación no identificada en GTR3033 fuese la responsable de la inducción de la bomba en respuesta a 2-TDC. Al mutante por inserción, al que denominamos G20345i, se le transfirió la fusión traduccional *p20347::mCherry* para medir la inducción de la fluorescencia en presencia de 2-TDC y compararla con la de la cepa silvestre GR4 y con GTR3033. La construcción de la cepa G20345i se detalla en la sección de Anexo 3.2.

La presencia de 2-TDC indujo la expresión del gen reportero tanto en el transposante como en el interposante, y de nuevo se pudo comprobar cómo en la cepa GR4 la actividad del promotor de *smb20347* no se vio afectada por la MK en comparación al control (Figura 3.7). Curiosamente, en la situación control con etanol la cepa G20345i mostró la misma fluorescencia que la cepa parental, en contraste a lo que le ocurre a GTR3033. Esto nos hace pensar que la mayor expresión de la fusión en el fondo *smb20345::Tn5lux* pueda deberse más bien a algún efecto no controlado del transposón.

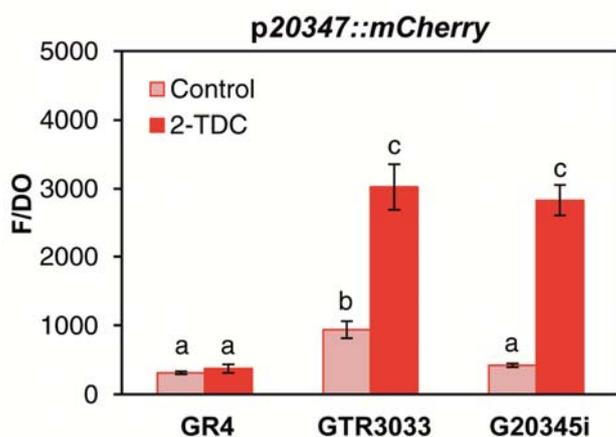


Figura 3.7: Fluorescencia relativa (F/DO) de la fusión p20347::mCherry en distintos fondos genéticos. La fluorescencia se midió a partir de células crecidas durante 24 horas en MM_{AN} (1% agar). Como siempre, la 2-TDC se aplicó en su forma volátil (1 μ mol en la tapa de la placa) y se usó etanol como control. El gráfico muestra la F/DO media y su error estándar a partir de al menos doce mediciones tomadas de dos experimentos independientes. Las distintas letras indican diferencias

significativas de acuerdo a un test ANOVA ($P \leq 0,05$). Se ha sustraído de la media final la fluorescencia de las mismas cepas con la construcción control con *mCherry* sin promotor.

Seguidamente llevamos a cabo experimentos de complementación, introduciendo en la cepa G20345i con la fusión p20347::mCherry un plásmido (pWBT20345) que permitía sobreexpresar el gen *smb20345* bajo la dirección de un promotor inducible por IPTG. En la sección Anexo 3.2 se detalla la estrategia para el clonaje de *smb20345* en el plásmido pWBT5 (Schlüter *et al.* 2015). En ausencia del inductor IPTG, la fluorescencia emitida por la cepa G20345i conteniendo el plásmido pWBT20345 en respuesta a 2-TDC se incrementó con respecto a etanol, incluso significativamente más que en la cepa portando el plásmido control pWBT5 vacío (Figura 3.8a). Cuando se indujo la expresión de *smb20345* mediante la adición al medio de IPTG (100 μ M), la fluorescencia emitida en respuesta a 2-TDC disminuyó hasta alcanzar casi los niveles mostrados en el control con etanol (Figura 3.8b). Como era de esperar, la fluorescencia de la fusión en la cepa que portaba el plásmido pWBT5 vacío, se mantuvo prácticamente igual que en ausencia de IPTG. Por lo tanto, la sobreexpresión de *smb20345* hizo que, de forma similar a como ocurre en GR4, la presencia de 2-TDC no indujese apenas la expresión del operón de la bomba, probablemente al restaurarse el flujo de la misma.

Aunque estos ensayos se volverán a realizar con un nuevo mutante obtenido por delección en fase del gen *smb20345*, para demostrar que la inducción del operón de la bomba es exclusivamente debida a la ausencia de actividad de ésta, gracias a estos experimentos realizados con el mutante por inserción G20345i y a los ensayos de complementación, podemos decir que es la pérdida de función en la bomba RND y no otra mutación adicional lo que hace que se induzca la expresión del operón *smb20345-smb20346-smb20347* en presencia de 2-TDC.

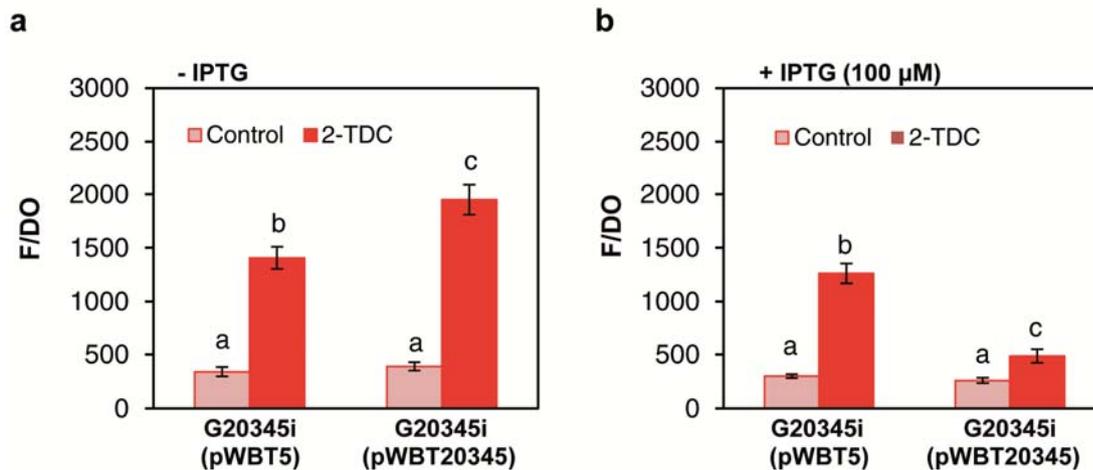


Figura 3.8: La expresión *en trans* del gen *smb20345* reduce la expresión de la fusión *p20347::mCherry* en presencia de 2-TDC. Los gráficos muestran la fluorescencia relativa (F/DO) de dicha fusión en células de G20345i portando las construcciones pWBT5 y pWBT20345. Dichas células se crecieron en MM_{AN} (1% agar) con los distintos tratamientos (etanol o 1 µmol de 2-TDC) en (a) ausencia o (b) presencia de IPTG (100 µM). La F/DO media junto con su error estándar se calculó a partir de al menos 12 medidas en dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticas según un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$) se señalan con distintas letras.

3.3.4. Respuesta del transposante GTR3033 a 2-TDC en diferentes condiciones de cultivo

Hasta ahora, todos los ensayos de expresión del operón de la bomba en respuesta a 2-TDC se habían realizado con células crecidas en medio semisólido y aplicando 1 µmol de la MK en su forma volátil. Quisimos analizar si la 2-TDC tenía efecto no sólo como volátil sino también aplicada al medio, y si la inducción de los genes de la bomba dependía de la dosis añadida de MK. Estos análisis se realizaron con la cepa GTR3033 como cepa reportera.

En primer lugar se hizo una curva dosis-respuesta en células incubadas en MM líquido durante 24 horas, aplicando distintas concentraciones de 2-TDC en el rango de µM. La luminiscencia se fue incrementando a medida que aumentaba la concentración de MK en contacto con la cepa GTR3033, hasta llegar a un máximo que se alcanzó con 50 µM de 2-TDC (Figura 3.9a). Concentraciones superiores, aunque seguían induciendo la expresión de la bomba con respecto al control con etanol, produjeron una bajada en la emisión de luz. Por lo tanto, al igual que ocurre con la promoción de la movilidad, existe un rango de concentraciones en el que se obtiene una respuesta óptima.

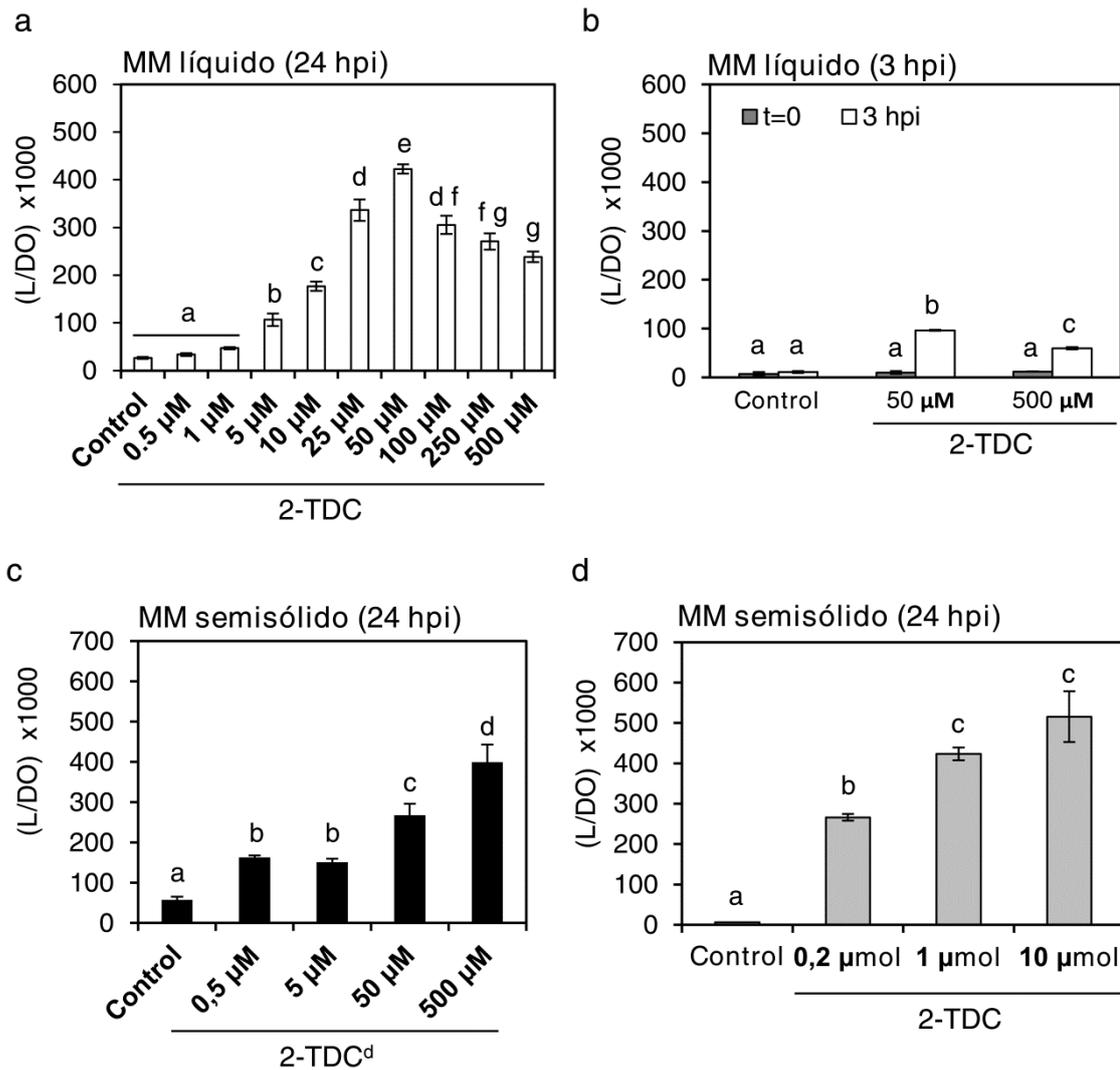


Figura 3.9: Respuesta de *S. meliloti* GTR3033 a 2-TDC en distintas condiciones de cultivo. (a) Curva dosis-respuesta en MM líquido tras 24 horas de incubación. **(b)** Respuesta de GTR3033 crecida en MM líquido tras una inducción corta (3 horas) con 2-TDC (50 y 500 µM). Además de los ensayos en líquido, se muestra la luminiscencia relativa de GTR3033 crecida en placas de MM_{AN} (1% agar) aplicando distintas cantidades de 2-TDC **(c)** disuelta en el medio (2-TDC^d) o **(d)** aplicada como volátil. En todos los casos se adicionó etanol como tratamiento control. Las barras de error representan el error estándar de la media calculado a partir de un mínimo de 8 medidas en dos experimentos independientes. Las diferentes letras señalan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a un análisis ANOVA (P<0,05).

Quisimos también saber si la inducción de la bomba en respuesta a 2-TDC es un fenómeno que se produce rápidamente. Como vemos en la Figura 3.9b, aunque no se consiguen los niveles de bioluminiscencia que se dan con incubaciones más prolongadas, con tres horas de incubación en presencia de 2-TDC ya se obtiene una inducción que es significativa con respecto al control con etanol. De nuevo vemos que a concentraciones altas la 2-TDC pierde poder inductor.

En cuanto al nivel de respuesta de células crecidas en placa, vemos que la 2-TDC disuelta en el medio también es capaz de estimular la expresión de la bomba y también existe cierta correlación entre la dosis y la respuesta (Figura 3.9c). En este caso la aplicación de 500 μM de 2-TDC si generó mayor emisión de luz que 50 μM . Es posible que el estado del medio (líquido o sólido) influya de alguna manera en la disponibilidad de la MK y que eso modifique el grado de inducción.

También la aplicación de distintas cantidades de 2-TDC como compuesto volátil dio lugar a mayor o menor respuesta (Figura 3.9d). Aunque en términos generales se consiguió mayor inducción con 10 μmol de la MK, la diferencia con respecto a 1 μmol no fue significativa.

Por lo tanto, la 2-TDC ejerce su efecto inductor aplicada tanto como volátil como disuelta en el medio de cultivo, existiendo una dependencia de la dosis en el grado de inducción obtenida.

3.3.5. Respuesta del transposante GTR3033 a otros compuestos

Las bombas RND pueden desempeñar múltiples funciones importantes para la fisiología de las bacterias: detoxificación de metales pesados y compuestos naturales y xenobióticos tóxicos, mantenimiento de la homeostasis, transporte de metabolitos, e incluso transporte de factores de virulencia y moléculas señal (Anes *et al.* 2015; Martínez *et al.* 2009). Sin embargo, el principal interés que ha suscitado el estudio de estos complejos multiproteicos es su papel en las resistencias, tanto intrínsecas como adquiridas, frente a los antibióticos. Dado que estas bombas son capaces de reconocer y transportar una gran variedad de sustratos químicamente diferentes, nos propusimos evaluar la especificidad de respuesta de la bomba frente a distintos compuestos, utilizando como cepa reportera a GTR3033.

Comenzamos por analizar la expresión de la bomba en respuesta a diferentes antibióticos: tetraciclina (Tc), el aminoglucósido gentamicina (Gm) y cloranfenicol (Cm). En primer lugar determinamos una concentración mínima para cada antibiótico a la cual el crecimiento de *S. meliloti* se viese claramente afectado. Para ellos empleamos la cepa silvestre GR4, la cual se creció en MM líquido suplementado con distintas concentraciones de cada antibiótico. En la Figura 3.10 se muestran las curvas de

crecimiento a partir de las cuales se decidió usar 0,05, 0,4 y 5 $\mu\text{g/ml}$ de Tc, Gm y Cm, respectivamente

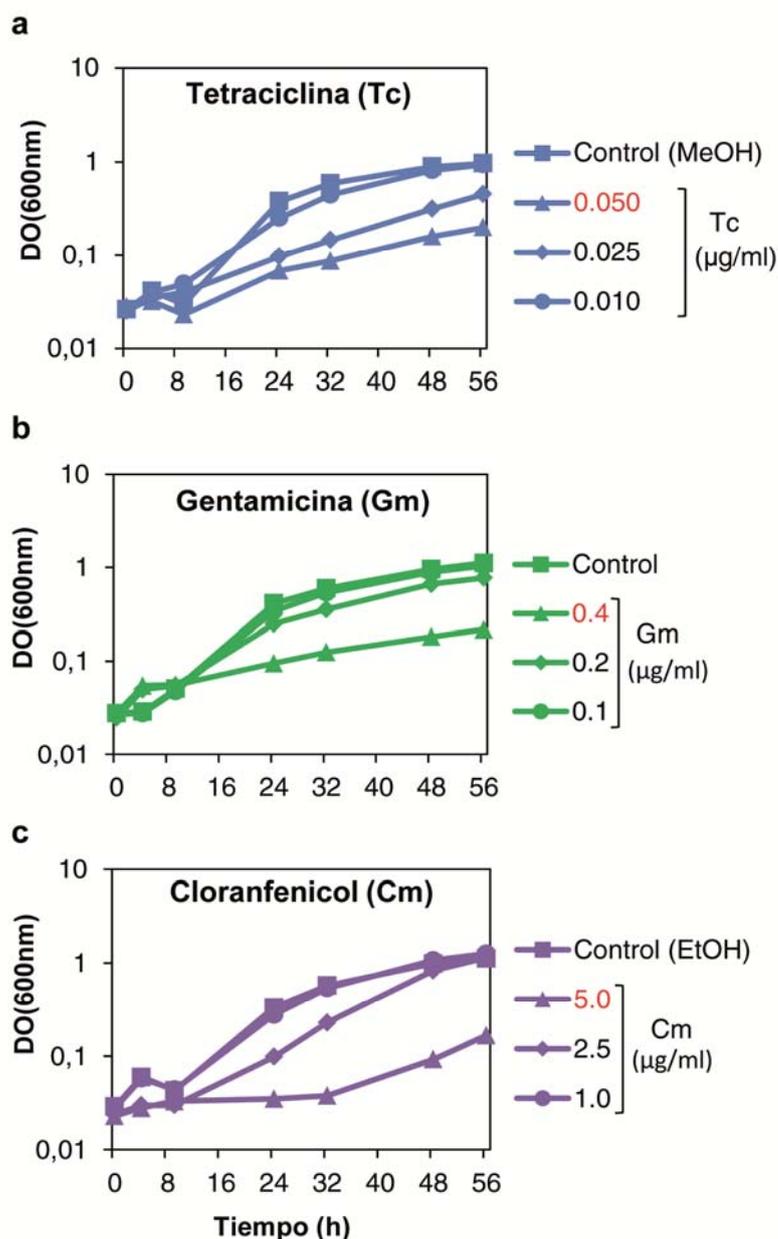


Figura 3.10: Curvas de crecimiento de *S. meliloti* GR4 en MM líquido suplementado con distintas concentraciones de (a) tetraciclina, (b) gentamicina, y (c) cloranfenicol. Los tratamientos se aplicaron partiendo de soluciones 1000 veces concentradas. Como control para Tc y Cm se adicionaron los solventes en los que estaban preparados estos antibióticos (metanol y etanol, respectivamente). La mínima concentración inhibitoria de cada antibiótico elegida para los experimentos de bioluminiscencia se marca en rojo.

. Una vez establecidas las condiciones de cultivo con los distintos antibióticos, se midió la luminiscencia de la cepa GTR3033 antes y después de la inducción con los mismos. Tras 3 horas de inducción, ninguno de los antibióticos analizados produjo incrementos en la expresión del operón *lux* en comparación al control y a la expresión antes de la inducción (Figura 3.11). Extrañamente, la luminiscencia de GTR3033 tras la incubación se incrementó de forma significativa en uno de los tratamientos control (Figura 3.11c); sin embargo esto puede ser debido simplemente a la variabilidad

experimental, ya que en otros experimentos de inducción corta realizados con GTR3033 en los que se utilizó etanol no se vio este incremento (véase Figura 3.9b).

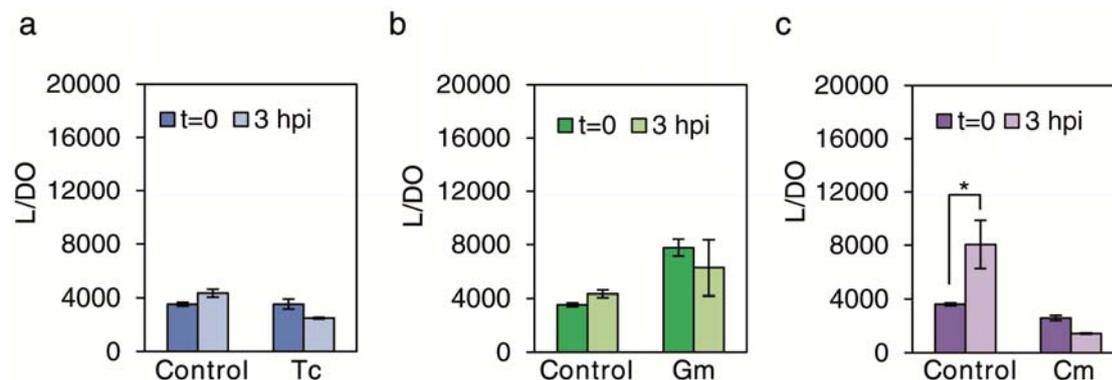


Figura 3.11: Luminiscencia (L/DO) emitida por la cepa GTR3033 en presencia de diferentes antibióticos. La luminiscencia se midió en células crecidas en MM líquido antes ($t = 0$) y después de inducir durante tres horas (3 hpi) con **(a)** 0,05 µg/ml de Tc, **(b)** 0,4 µg/ml de Gm, y **(c)** 5 µg/ml de Cm. En la figura se muestran los resultados de un experimento representativo. La media y el error estándar de la luminiscencia relativa se calculó a partir de dos réplicas técnicas. El asterisco indica diferencias significativas de acuerdo a un análisis ANOVA ($P \leq 0,05$).

Aunque para descartar que esta bomba no transporte antibióticos se ha de hacer un análisis más amplio utilizando más familias de estos compuestos, las familias que hemos estudiado no parecen ser sustratos de la bomba.

El siguiente paso en el análisis de la especificidad de respuesta por parte de GTR3033, fue medir la bioluminiscencia emitida en presencia de otras cetonas alifáticas, así como también frente a otros compuestos de naturaleza lipídica tales como aldehídos alifáticos, ácidos grasos o acil-homoserina lactonas.

En primer lugar, y tal y como se hizo en los ensayos de movilidad, se probó a crecer la cepa GTR3033 en presencia de distintas cetonas que diferían de la 2-TDC en la longitud de la cadena alifática o en la posición del grupo carbonilo.

En el primer caso, las MK que mayor inducción de la luminiscencia provocaron fueron la 2-TDC y la 2-PDC (C13 y C15). A medida que nos alejábamos por arriba o por abajo de esas longitudes de cadena iba disminuyendo la intensidad de la bioluminiscencia (Figura 3.12a). Con respecto a la influencia del grupo carbonilo, la 3-TDC y la 4-TDC indujeron mayor luminiscencia que el tratamiento control con etanol, pero de nuevo fue la 2-TDC la que generó mayor respuesta, mientras que la 7-TDC no tuvo efecto (Figura 3.12b).

Estos perfiles de expresión se asemejan al perfil de movilidad mostrado por la cepa GR4, y de nuevo ponen de manifiesto que tanto la posición del grupo carbonilo como

la longitud de cadena de la cetona juegan un papel importante en la actividad biológica.

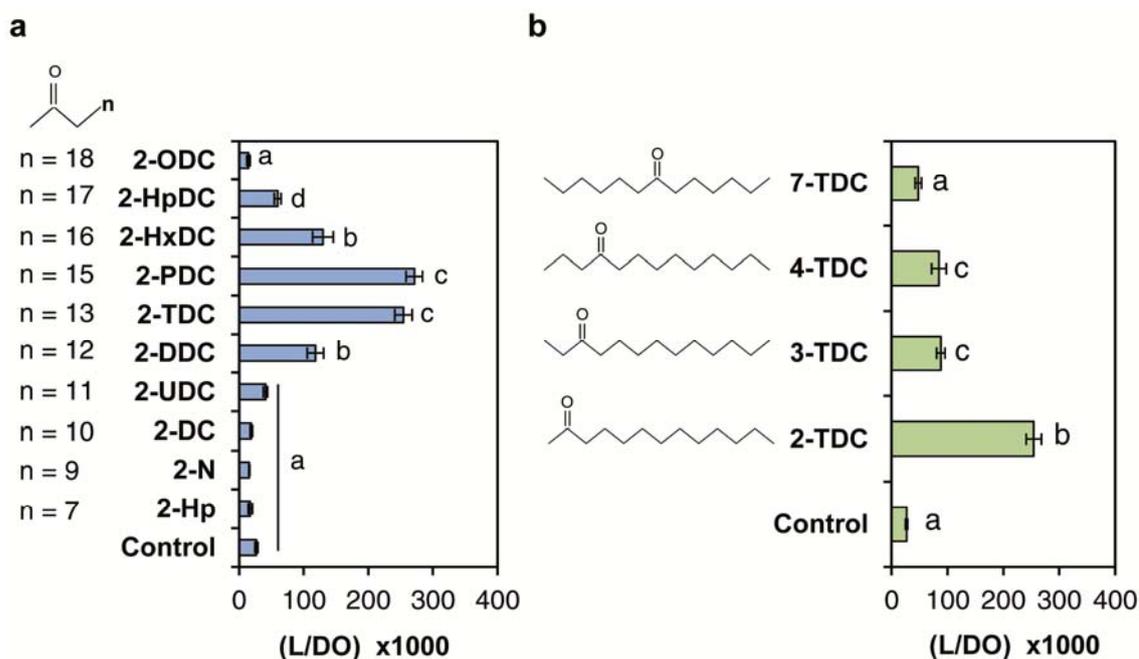


Figura 3.12: Respuesta de la cepa GTR3033 de *S. meliloti* a distintas cetonas alifáticas. Se evaluó la luminiscencia relativa (L/DO) en células crecidas durante 24 horas sobre placa de MM_{AN} (1% agar) en presencia de **(a)** metilcetonas con distinta longitud de cadena o **(b)** cetonas C13 con el grupo carbonilo en distinta posición. Se aplicó 1 μ mol de cada compuesto en la tapa de la placa a partir de soluciones madre preparadas a 50 mM. Como control se aplicó etanol. Las barras muestran la media con su correspondiente error estándar calculada a partir de un mínimo de doce medidas en dos experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con distintas letras.

Además de a cetonas, la cepa GTR3033 respondía a otros volátiles tales como los aldehídos dodecanal (C12) y tridecanal (C13), si bien la mayor inducción de la luminiscencia se consiguió con el segundo, lo que concuerda con lo observado respecto de la influencia de la longitud de cadena (Figura 3.13a). Curiosamente la luminiscencia del transposante no se indujo cuando éste creció en presencia de ácidos grasos de cadena larga, ni siquiera con el ácido tridecanoico (C13). Algo llamativo fue la expresión de la bomba en presencia de ácido oleico, ya que incluso disminuyó en comparación al control (Figura 3.13b). Finalmente, se analizó la respuesta de la cepa GTR3033 a la AHL 3O-C16:1-HL, que presenta un sustituyente carbonilo en su cadena lateral. Aunque no se observó una inducción alta, ésta sí fue significativamente mayor en comparación al tratamiento control, tanto aplicando 5 μ M como 25 μ M de la AHL. Por debajo de 5 μ M ya no se observó diferencia con el control (Figura 3.13c).

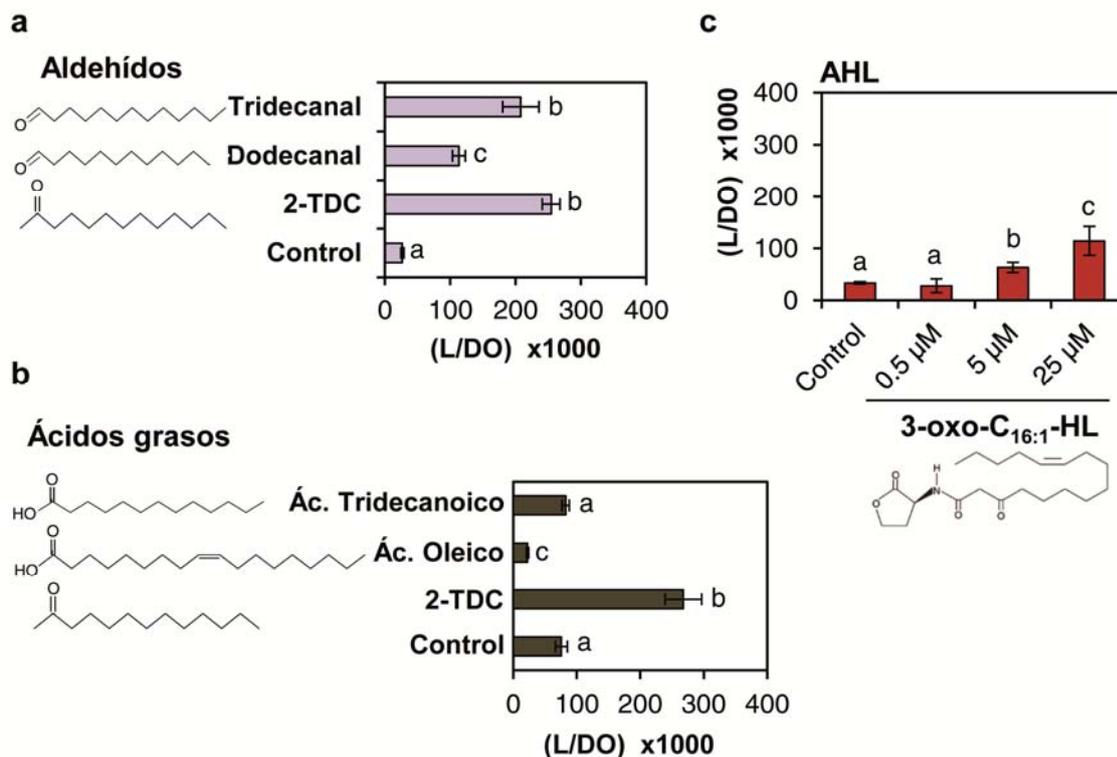


Figura 3.13: Respuesta de la cepa GTR3033 a otros compuestos alifáticos. (a) Comparación entre la MK 2-TDC y dos aldehídos de cadena larga, dodecanal (C12) y tridecanal (C13). Los compuestos fueron aplicados en su forma volátil, añadiendo 1 μmol a la tapa de la placa a partir de soluciones madre preparadas en etanol (control) a 50 mM. (b) Comparación entre 2-TDC y los ácidos grasos ácido tridecanoico y oleico. Dado que los ácidos grasos no son volátiles, los tratamientos fueron añadidos al medio, a una concentración final de 50 μM. (c) Respuesta de GTR3033 a distintas concentraciones de la AHL 3O-C16:1-HL adicionada al medio. Se partió de soluciones madre concentradas 400 veces y preparadas en AcN, que se utilizó como tratamiento control. En todos los casos, la cepa GTR3033 fue crecida en MM_{AN} (1% agar) e incubada con los tratamientos durante 24 horas. Los gráficos muestran la media y el error estándar de la luminiscencia relativa (L/DO), calculados a partir de al menos doce medidas en dos experimentos independientes. Las diferencias significativas de acuerdo a un test ANOVA ($P \leq 0,05$) se indican con distintas letras.

En resumen, del escrutinio realizado con los distintos compuestos alifáticos podemos decir que la inducción de la bomba no es específica para 2-TDC pero sí muestra mayor nivel de inducción con este tipo de moléculas que con otras. No obstante, los compuestos que consiguieron inducir la expresión de la bomba en GTR3033 sí compartían ciertas características estructurales; presentaban un sustituyente carbonilo y tenían una longitud de cadena de 12 a 17 átomos de carbono. Por lo tanto, sí podemos hablar de una cierta especificidad por parte de la bomba.

Es interesante la respuesta frente a las AHL. Se han descrito en diversas bacterias bombas de la familia RND implicadas en el transporte de AHL de cadena larga, las cuales no pueden atravesar libremente la membrana debido a su naturaleza

hidrofóbica (Chan *et al.* 2007; Pearson *et al.* 1999). Para investigar más en esta cuestión, se analizó la actividad de la región promotora de la bomba en respuesta a varias AHL, que se diferenciaban, o bien en la longitud de la cadena lateral, o bien en la presencia o no de un sustituyente carbonilo en el C3 de dicha cadena.

Para estos ensayos se utilizó la cepa GTR3033 que portaba la fusión transcripcional del promotor de la bomba al gen reportero *lacZ* (*p20347::lacZ*). Se midió la actividad β -galactosidasa de células crecidas durante 24 horas en MM líquido y en presencia de las distintas AHL. Además de la 3O-C16:1-HL se analizaron la N-3-oxo-octanoil-L-homoserina lactona (3O-C8-HL), la N-tetradecanoil-L-homoserina lactona (C14-HL) y la N-3-oxo-tetradecanoil-L-homoserina lactona (3O-C14-HL). Para hacer una comparativa entre el nivel de inducción de una AHL con una MK, se incluyeron en los análisis la 2-TDC y la 2-PDC.

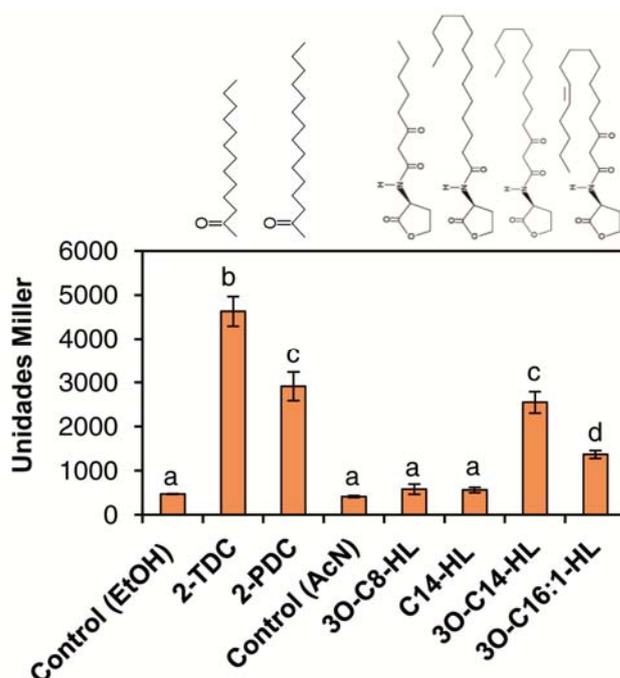


Figura 3.14: Actividad promotora de *smb20347* en *S. meliloti* GTR3033 en respuesta a distintas AHL. El gráfico muestra la actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) de la construcción reportera *p20347::lacZ* contenida en la cepa mutante en la bomba GTR3033. Dicha cepa se incubó durante 24 horas en MM líquido suplementado con los distintos tratamientos a una concentración final de 50 μ M. Como control del solvente de las MK o las AHL se adicionó al medio etanol o AcN, respectivamente. Las barras representan la media junto con su error estándar, calculados a partir de un mínimo de seis medidas en tres experimentos independientes. Las diferencias significativas según un test ANOVA ($P \leq 0,05$) se indican con distintas letras. La estructura química de los distintos compuestos analizados se muestra en la parte superior del gráfico.

Curiosamente, en cultivo líquido la 2-PDC mostró menos actividad inductora que la 2-TDC, algo que no ocurría cuando se aplicaba como volátil en medio semisólido. Por lo que se vio con la 2-TDC la concentración del inductor influye en la expresión de la bomba, y es posible que la concentración de 2-PDC presente en el líquido ya esté por encima de la óptima. De las diferentes AHL analizadas sólo la 3O-C14-HL y la 3O-C16:1-HL indujeron la expresión del promotor, y dentro de ellas la primera mostró

significativamente mayor actividad que la segunda. Ni la 3O-C8-HL (cadena corta y con sustituyente carbonilo) ni la C14-HL (cadena larga sin sustituyente) indujeron la expresión de la fusión (Figura 3.14). Estos resultados suponen una evidencia más de que esta bomba puede estar reconociendo compuestos alifáticos de cadena larga con sustituyentes carbonilo, como son las metilcetonas, aldehídos y también las AHL.

3.3.6. Fenotipo simbiótico del transposante GTR3033

Finalmente, se estudió el fenotipo simbiótico del transposante comparando su capacidad infectiva y la eficiencia en la formación de nódulos con la de la cepa silvestre GR4. Para estos ensayos se utilizaron plantas de alfalfa crecidas en cultivo hidropónico.

El transposante GTR3033 fue capaz de inducir la formación de nódulos rosados, lo cual era indicativo de que se trataba de nódulos fijadores (datos no mostrados). Esto se tradujo en que el aspecto de las plantas inoculadas con la cepa mutante mostraban un desarrollo y un aspecto normales, igual que con la cepa silvestre GR4. En cuanto a la eficiencia en la tasa de formación de nódulos, las cinéticas de nodulación de ambas cepas fueron muy similares, con lo que GTR3033 no tiene afectada su capacidad infectiva (Figura 3.15a).

Cuando se analizó el efecto de la 2-TDC, se vio que la MK causaba el mismo retraso en la cepa silvestre que en el mutante (Figura 3.15b). Esto sugiere que el efecto negativo de la 2-TDC en nodulación no está mediado a través de la bomba.

Además de la capacidad infectiva, se midió también la capacidad competitiva coinoculando el transposante con la cepa marcada GR4 (pGUS3). Tampoco en este caso se vieron diferencias en la habilidad por la ocupación de los nódulos (datos no mostrados).

Por lo tanto, en nuestras condiciones experimentales, la mutación en la bomba no tiene efectos en la capacidad simbiótica de *S. meliloti*.

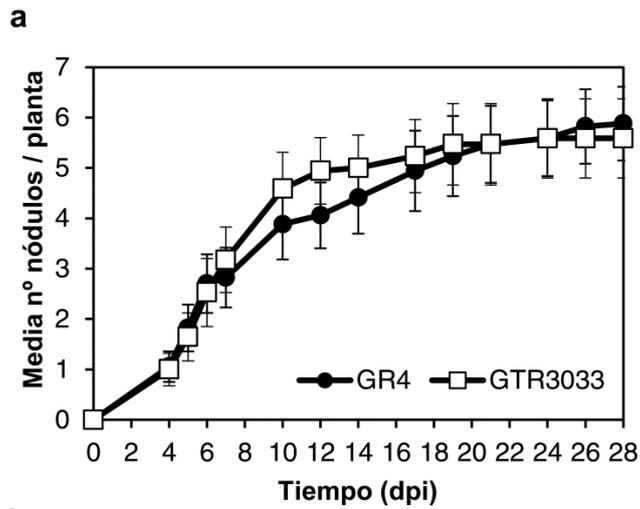
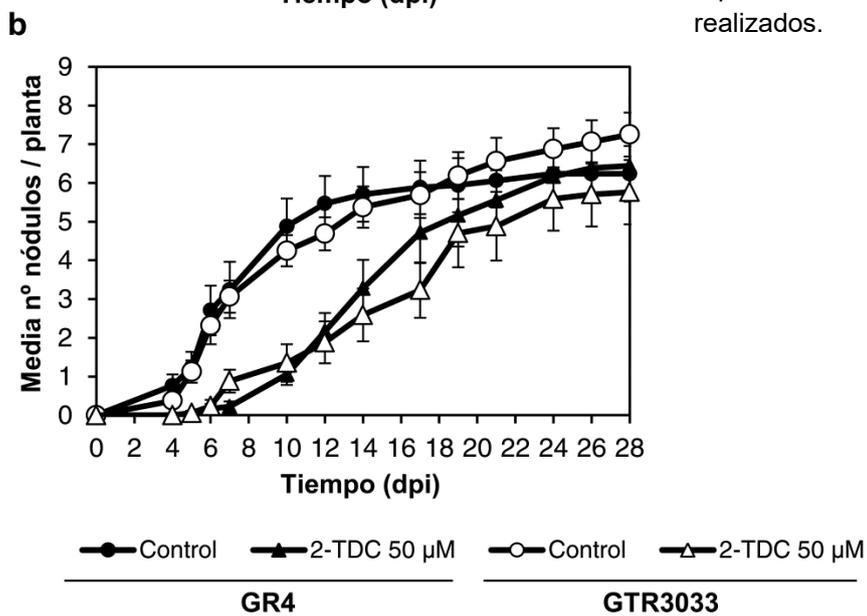


Figura 3.15: El transposante GTR3033 es capaz de inducir de forma eficiente nódulos fijadores de nitrógeno. **(a)** Comparación del número medio de nódulos por planta inducidos por *S. meliloti* GR4 y su derivado GTR3033 en plantas de alfalfa. **(b)** Efecto de la 2-TDC en la capacidad infectiva de GTR3033 en comparación a la cepa parental GR4. Se muestra un experimento representativo de al menos dos realizados.



ANEXOS CAPÍTULO 3

Anexo 3.1 Estrategia para la identificación del sitio de inserción del mini-Tn5 *luxCDABE* en los transposantes GTR.

Para identificar el sitio de inserción del mini-Tn5 *lux* se clonó en el vector pUC18 (Yanisch-Perron *et al.* 1985) uno de los extremos de dicha construcción, que contenía el gen de resistencia a Km y llevaba adosado un fragmento de ADN genómico que posteriormente se secuenció (línea roja discontinua en Figura A3.1). Para ello nos servimos de los sitios *Pst*I contenidos en el Tn5 *lux*. Se digirió con esta enzima el ADN genómico de los transposantes GTR3033, GTR13136 y GTR15852 y el producto de la digestión se ligó al pUC18 digerido también con *Pst*I. Con el producto de ligación se transformó la cepa DH5 α de *E. coli* y mediante selección en LB Ap Km se pudieron obtener los clones que contenían el fragmento de interés. Para seleccionar el clon más adecuado a la hora de secuenciar, se analizaron los perfiles de restricción *Pst*I y *Bam*HI de los posibles candidatos. Para la secuenciación se utilizaron los oligos Universal y Reverso (Tabla M4).

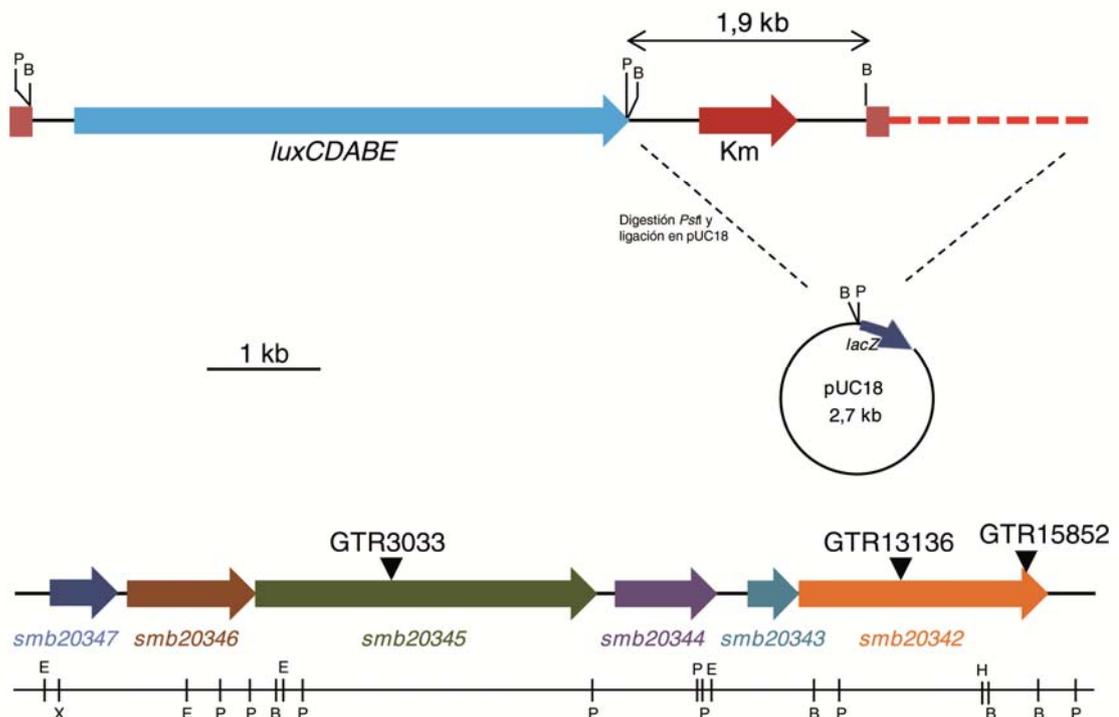


Figura A3.1: Representación esquemática del procedimiento de clonaje para identificar el punto de inserción del Tn5 *lux*. En la figura se muestra el mapa del transposón (zona comprendida entre los rectángulos color rosa) y de la región genómica de los genes afectados por éste (triángulos) en los distintos transposantes. Se indican los sitios de restricción para las enzimas más comunes: *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Hind*III (H), *Pst*I (P), *Xba*I (X).

Anexo 3.2 Estrategias para la construcción de los distintos plásmidos y cepas empleados en el Capítulo 3.

Construcción de las fusiones traduccionales p20346::mCherry y p20347::mCherry

Para medir la actividad del teórico promotor de *smb20346* y *smb20347*, se amplificaron por PCR a partir del ADN genómico de GR4 dos regiones de unas 320 pb, situadas aguas arriba de ambos genes y que contenían los cinco primeros codones de éstos. Para esta PCR se utilizaron las parejas de oligos Pb46-F/Pb46-R y Pb47-F/Pb47-R que generan en los extremos las dianas de restricción *HindIII* y *XbaI* para el posterior clonaje (Tabla M4). Tras comprobar que la secuencia de dichos productos de PCR era correcta, se clonaron los teóricos promotores como fragmentos *HindIII-XbaI* en el plásmido pPHU231mCherry (McIntosh, no publicado), obteniéndose así las construcciones pPHU20136 y pPHU20347.

Los plásmidos se transfirieron finalmente a las cepas de *S. meliloti* de interés mediante conjugación biparental con la cepa donadora S17.1 de *E. coli*. La selección del cruce se hizo en MM suplementado con Tc.

Construcción de la fusión transcripcional p20347::lacZ

Para aislar el fragmento de la región aguas arriba de *smb20347* clonada en el plásmido pPHU20347, se hizo una PCR con los oligos Pb47-F y Pb47-R utilizando el ADN aislado de dicha construcción como molde. Tras esto se clonó el producto de PCR en el vector pCR-2.1-TOPO y se comprobó su secuencia. Finalmente se aisló dicho producto desde TOPO mediante digestión *BamHI/XbaI* y se subclonó en el plásmido pMP220 digerido con las enzimas *BglII/XbaI*, verificando que la región promotora de *smb20347* se había insertado en la orientación correcta con respecto al gen *lacZ*.

El plásmido resultante, pMP20347, se transfirió a las cepas de *S. meliloti* de interés por conjugación biparental con la cepa S17.1 de *E. coli*. La selección del cruce se hizo en MM suplementado con Tc.

Construcción de la cepa G20345i (*smb20345::pK18mob*)

Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida sobre el gen *smb20345* se clonó en el vector suicida *pK18mob* (Schäfer *et al.* 1994) un fragmento interno de dicho gen de unas 550 pb. Dicho fragmento se obtuvo por PCR a partir del ADN genómico de GR4, utilizando los oligos 20345i-F y 20345i-R que generaban en los extremos dianas de restricción *Xba*I y *Kpn*I (Tabla M4). Tras comprobar por secuenciación que el fragmento se había amplificado correctamente, se clonó en *pK18mob* mediante digestión con las enzimas *Xba*I y *Kpn*I y posterior ligación, obteniéndose el plásmido *pK20345i*.

Dicho plásmido se transfirió a *S. meliloti* GR4 por conjugación biparental con la cepa donadora de *E. coli* S17.1 y se seleccionaron los teóricos candidatos mediante crecimiento en MM suplementado con Km. El sitio de inserción del *pK18mob* en los candidatos seleccionados se comprobó por PCR y posterior secuenciación.

Construcción del plásmido *pWBT20345* para la sobreexpresión de *smb20345*

La secuencia codificante del gen *smb20345* se obtuvo mediante amplificación por PCR desde ADN genómico de GR4, utilizando los oligos 20345c-F y 20345c-R, los cuales generan dianas de restricción *Xba*I y *Kpn*I en los extremos del producto de PCR (Tabla M4). Dicho producto se secuenció previamente a su clonaje en el plásmido *pWBT5* (Schlüter *et al.* 2015), en el que la transcripción del gen *smb20345* está bajo el control de un promotor fuerte inducible por IPTG.

El plásmido resultante *pWBT20345* así como el plásmido vacío *pWBT5*, se transfirieron a las cepas de interés mediante cruce conjugativo con *E. coli* S17.1, seleccionando en MM con Gm.

DISCUSIÓN GENERAL

Discusión general

El objetivo general del grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo de Tesis Doctoral se centra en identificar nuevos mecanismos moleculares implicados en etapas tempranas de la interacción *Rhizobium*-leguminosa. Mientras los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno que tienen lugar en el establecimiento de la simbiosis han sido investigados en profundidad por su relevancia ecológica y agrónoma, el conocimiento existente sobre procesos como adsorción bacteriana y posterior colonización de la superficie de la raíz, así como el comienzo del proceso infectivo, es escaso. Estos procesos que tienen lugar en las primeras etapas del establecimiento de la simbiosis, no son específicos de la interacción *Rhizobium*-leguminosa, por lo que el conocimiento adquirido podría ser extrapolable a otras interacciones planta-bacteria. Algunos de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, refuerzan esta idea.

El estudio de las bases moleculares que rigen la movilidad en superficie de la bacteria modelo *Sinorhizobium meliloti*, está permitiendo realizar algunos avances para comprender lo que ocurre en las primeras etapas de la interacción. Desde hace tiempo, tomando como fundamento diversos estudios realizados en bacterias que carecían de flagelos o eran incapaces de mostrar movilidad *swimming*, se acepta que la movilidad bacteriana no es esencial para la nodulación o la fijación simbiótica de nitrógeno, aunque sí influye en la eficiencia de nodulación y capacidad competitiva, al dirigir a los rizobios hacia los sitios más adecuados para la infección de la planta hospedadora (Miller *et al.* 2007; Fujishige *et al.* 2006a; Yost *et al.* 1998; Caetano-Anollés *et al.* 1992, 1988; Mellor *et al.* 1987; Soby & Bergman 1983; Ames & Bergman 1981). Sin embargo, existe poca información sobre otros aspectos de la movilidad de los rizobios, como el desplazamiento en superficie. En bacterias patógenas, algunos tipos de translocación en superficie se han relacionado estrechamente con la virulencia de estos microorganismos. Es el caso de la movilidad *swarming*, un tipo de desplazamiento multicelular en superficie, dependiente de acción flagelar y que conlleva un proceso de diferenciación celular que acarrea importantes cambios en expresión génica, destacando la sobre-expresión de genes de virulencia (Verstraeten *et al.* 2008). La movilidad *swarming* y la formación de biofilms o comunidades sésiles asociadas a superficies son dos fenómenos opuestos pero estrechamente ligados. Ambos procesos son fenómenos multicelulares en los que la comunicación célula a célula desempeña un papel importante, confieren resistencia a antimicrobianos y en ellos se han implicado las mismas estructuras celulares y mecanismos reguladores. Aunque aún poco estudiada, la conexión entre *swarming* y biofilm también parece

existir en *S. meliloti*, y el control correcto de estos procesos parece ser importante para una eficiente interacción con la planta (Amaya-Gómez *et al.* 2015).

Precisamente, derivado de la caracterización de un mutante *fadD* de *S. meliloti* que mostraba translocación en superficie alterada, defectos en la formación de biofilm y en la capacidad de colonizar y nodular eficientemente plantas de alfalfa, se identificó la 2-tridecanona (2-TDC), objeto de estudio de esta Tesis, cuyo papel en la biología de *S. meliloti* ha sido investigado. Los resultados obtenidos avalan la caracterización de la movilidad en superficie de *S. meliloti* como una estrategia adecuada para la identificación de nuevos mecanismos que participan no sólo en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, sino en otras interacciones planta-bacteria, y que podrían tener futuras aplicaciones biotecnológicas.

La 2-Tridecanona (2-TDC) es una señal volátil en bacterias y dificulta el establecimiento de interacciones planta-bacteria.

La identificación de 2-TDC asociada a un mutante *fadD* de *S. meliloti* afectado en comportamientos bacterianos asociados a superficie (movilidad y formación de biofilms) y en la interacción con plantas de alfalfa, hizo pensar desde un principio que este compuesto fuese responsable, al menos en parte, de los fenotipos mostrados por dicho mutante. Los resultados obtenidos en este trabajo, que se suman a otras investigaciones realizadas en el grupo, no sólo han corroborado esa hipótesis, sino que han desvelado a la 2-TDC como una nueva molécula señal en bacterias que actúa además como compuesto volátil.

La 2-TDC es una metilcetona (MK) volátil conocida como insecticida natural. Producida en cantidades importantes por tricomas glandulares tipo VI presentes en hojas de especies silvestres de tomate (*Solanum habrochaites* subsp. *glabratum*), se la ha relacionado con la alta resistencia innata de estas plantas frente al ataque de insectos herbívoros (Williams *et al.* 1980). Aunque en la literatura está descrita la producción de 2-TDC por diversas plantas (Kirillov *et al.* 2017; Ghribi *et al.* 2016; Antonious, 2013; Williams *et al.* 1980), animales (Wood *et al.* 1995; Soini *et al.* 2007) y numerosos aislados bacterianos (Lemfack *et al.* 2014; Forney & Markovetz 1971; Tabla I.1), los resultados presentados en esta memoria son los primeros en los que se constatan los efectos de esta metilcetona sobre comportamientos bacterianos. Datos anteriores de nuestro grupo, demostraban la capacidad de la 2-TDC para promover específicamente la movilidad en superficie de *S. meliloti*, actuando como compuesto volátil y a bajas concentraciones (Bernabéu-Roda 2014). Los resultados obtenidos en

esta Tesis han mostrado además que la MK afecta negativamente a la capacidad de *S. meliloti* para formar biopelículas. Por otro lado, en colaboración con otros grupos de investigación, hemos podido comprobar que esta molécula también afecta a la movilidad y la formación de biopelículas en bacterias filogenéticamente alejadas de *S. meliloti*, incluyendo patógenos vegetales y animales. Aunque el efecto de la MK en la movilidad es variable, pudiendo estimularlo o inhibirlo según la especie bacteriana, en todos los casos estudiados, la presencia de 2-TDC disminuye la formación de biofilm sin llegar a afectar el crecimiento bacteriano. Dado que el desplazamiento en superficie y la formación de biopelículas están controlados por distintos mecanismos dependiendo de la especie, es necesario hacer estudios empleando diferentes modelos bacterianos para así poder identificar posibles dianas moleculares comunes y/o específicas de la 2-TDC. En cualquier caso, los resultados obtenidos en este trabajo indican que la 2-TDC es una nueva molécula de señalización en bacterias que, actuando como volátil, podría participar no sólo en comunicación intra- e inter-específica sino incluso en comunicación con organismos superiores, con importantes consecuencias para la ecología de estos microorganismos.

Investigaciones realizadas en las últimas décadas han revelado que las bacterias son capaces de producir una gran variedad de compuestos orgánicos volátiles (VOCs) como metabolitos secundarios (Tyc *et al.* 2017; Schulz-Bohm *et al.* 2015; Peñuelas *et al.* 2014; Bitas *et al.* 2013; Effmert *et al.* 2012; Insam & Seewald 2010; Kai *et al.* 2009). Hasta la fecha se han descrito más de 1000 y se piensa que esta cifra está subestimada. Los VOCs bacterianos desempeñan gran variedad de funciones, muchas de ellas de gran relevancia, entre las que podemos destacar el efecto inhibitor del crecimiento de patógenos de plantas y animales, o el efecto beneficioso de algunos de ellos sobre el crecimiento y resistencia vegetal frente a distintos estreses tanto bióticos como abióticos (revisado en Audrain *et al.* 2015a). Aunque la mayor parte de los estudios sobre VOCs bacterianos se han centrado en los efectos que causan en organismos eucariotas, se incrementa el número de publicaciones que indican que estos metabolitos secundarios pueden actuar como señales químicas para la comunicación intra e interespecífica en bacterias a corta y larga distancia (Tyc *et al.* 2017; Schmidt *et al.* 2015; Audrain *et al.* 2015a, 2015b; Molina-Santiago *et al.* 2014; Garbeva *et al.* 2014; Kim *et al.* 2013). Nuestro trabajo añade la 2-TDC a la lista creciente de este tipo de compuestos. Sin embargo, aunque son varios los trabajos que describen la función señalizadora en bacterias de los VOCs, hasta el momento no está muy claro cómo son percibidos estos compuestos. En esta Tesis Doctoral,

utilizando *S. meliloti* como modelo, hemos intentado profundizar en los mecanismos a través de los cuales la 2-TDC afecta los fenotipos estudiados.

Nuestros datos indican que tanto la longitud de la cadena alifática como la posición del grupo carbonilo en la molécula determinan la actividad biológica de cetonas alifáticas, entendida ésta como la capacidad para promover movilidad en superficie. Estos resultados, junto con la interacción competitiva observada entre la 2-TDC y una cetona inactiva como es la 7-TDC, sugieren que pueden existir mecanismos de reconocimiento específicos mediados por un receptor.

Ya hemos indicado que la 2-TDC estimula específicamente movilidad en superficie sin alterar la movilidad tipo *swimming*. Este efecto específico contrasta con el observado en dos volátiles producidos por *Bacillus subtilis*, el ácido glioxílico y la 2,3-butanediona, los cuales reducen tanto la movilidad *swimming* como el *swarming* en diferentes bacterias (Kim *et al.* 2013). Además, la estimulación de la translocación en superficie de *S. meliloti* en respuesta a 2-TDC, está mediada por un mecanismo tanto dependiente como independiente de flagelos (Bernabéu-Roda 2014). Mientras que la estimulación de la movilidad mediada por flagelos puede explicarse por un incremento en la expresión de genes flagelares (Durán, 2015), el mecanismo a través del cual la 2-TDC estimula un movimiento en superficie que no requiere la acción de los flagelos se desconoce, y será objeto de futuras investigaciones en el grupo. No obstante, podemos descartar un efecto surfactante de la MK (Kotowska & Isidorov 2011), así como modificaciones de la envuelta celular causadas por la 2-TDC que pudieran favorecer el desplazamiento en superficie, tales como cambios en algunas propiedades fisicoquímicas de la envuelta o una posible elongación celular e hiperflagelación.

Los fenotipos alterados por la 2-TDC (movilidad en superficie y formación de biopelículas) se encuentran generalmente bajo el control por *quorum sensing* (QS) (Verstraeten *et al.* 2008). Nuestros resultados parecen indicar que en *S. meliloti* la 2-TDC no tiene efecto directo sobre la expresión de genes QS tales como *sinI*, *wgeA* o *smb20911*. Diferentes análisis de expresión génica llevados a cabo con cepas tanto *expR* como *expR*⁺ crecidas en distintas condiciones de cultivo no revelaron efectos de esta MK en la expresión de estos genes ni en su respuesta a la presencia de AHL. Sin embargo, hemos comprobado que la 2-TDC provoca la acumulación de estas moléculas. En las condiciones experimentales utilizadas y empleando distintas metodologías, se ha puesto de manifiesto que *S. meliloti* acumula AHL durante las primeras horas de crecimiento. Sin embargo, transcurridas 24-32 horas las AHL comienzan a desaparecer. La desaparición de AHL añadidas de forma exógena también tiene lugar en una cepa *sinI* (incapaz de sintetizar AHL), lo que sugiere que

las AHL son degradadas por *S. meliloti* al alcanzar determinado estado de crecimiento, un mecanismo que podría estar relacionado con la salida del estado QS. La 2-TDC parece interferir con el proceso de degradación de AHL, y por tanto con una salida del estado QS, ya que la concentración de estas señales no disminuye con el crecimiento bacteriano cuando la MK se encuentra presente. Curiosamente, recientes estudios han demostrado que la actividad FadD de la proteína RpfB de bacterias fitopatógenas del género *Xanthomonas*, participa en el *turnover* de señales QS pertenecientes a la familia DSF (*Diffusible Signal Factor*, ácidos grasos insaturados en posición 2-cis), siendo un mecanismo a través del cual la bacteria consigue salir del estado QS (Wang *et al.* 2016; Zhou *et al.* 2015). Sería interesante investigar si en *S. meliloti*, FadD puede ejercer una función similar y cuál es el papel que la 2-TDC desempeña en este proceso. El efecto causado por la 2-TDC en el metabolismo de AHL podría estar relacionado con los fenotipos alterados por la 2-TDC; por ejemplo, se ha descrito la capacidad de ciertas AHL para actuar como biosurfactantes que ayudan al desplazamiento en superficie en *Rhizobium etli* (Daniels *et al.* 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio con una cepa mutante en el gen *sinI* (y por tanto no productora de AHL), la cual es capaz de moverse en presencia de 2-TDC, indican que, aunque la acumulación de AHL en cepas *sinI*⁺ inducida por la MK puede tener algún efecto en la movilidad y/o la formación de biofilm, ésta no es la principal vía a través de la cual actúa la 2-TDC.

Producción de 2-TDC en *S. meliloti*.

En nuestras investigaciones, la 2-TDC fue originalmente identificada como compuesto presente exclusivamente en los sobrenadantes de cultivos del mutante *fadD* de *S. meliloti*, estando ausente en la cepa silvestre. Cambiando tanto las condiciones de cultivo como la metodología para la extracción de la MK hemos encontrado que la cepa silvestre GR4 de *S. meliloti* también es capaz de producir 2-TDC volátil en respuesta al crecimiento en superficie de medio semisólido, aunque a menores niveles que el mutante *fadD*. Existen datos en la literatura describiendo la producción de distintos volátiles por *S. meliloti*, algunos de ellos MK como 2-heptanona y 2-nonanona, tanto durante el crecimiento en vida libre como durante la interacción con la leguminosa modelo *Medicago truncatula* (Orozco-Mosqueda *et al.* 2013). No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo representan la primera evidencia de la producción de 2-TDC volátil por un rizobio. Además, nuestros datos indican que la

actividad de FadD, una acil-CoA ligasa específica de ácidos grasos de cadena larga, modula de algún modo la síntesis de 2-TDC en *S. meliloti*.

El conocimiento sobre las rutas bioquímicas implicadas en la síntesis de metilcetonas es escaso. Algunas bacterias metanotrofas producen MK a través de la degradación aeróbica de alquenos y alcanos (Patel *et al.* 1980). Por su parte, en hongos y plantas las MK son generadas tras un proceso de descarboxilación del 3-oxo-acil-CoA y del 3-oxo-acil-ACP, intermediarios que se forman en la degradación y síntesis de ácidos grasos, respectivamente (Yu *et al.* 2010; Forney & Markovetz 1971). Puesto que en *S. meliloti* la 2-TDC se acumula en un mutante *fadD*, nuestra hipótesis es que esta MK podría derivar del intermediario 3-oxo-miristoil-ACP (Figura D.1). Basándonos en el modelo propuesto de biosíntesis de 2-TDC en plantas (Yu *et al.* 2010), proponemos que una tioesterasa de *S. meliloti* similar a MKS2 de tomate, catalizaría la hidrólisis de 3-oxo-miristoil-ACP dando lugar a la formación de ácido 3-oxo-mirístico (14C). Una posterior descarboxilación de este ácido, espontánea o por acción de una enzima, daría lugar a 2-TDC. Esta hipótesis, así como también la posibilidad de que la 2-TDC se pueda producir a partir de otros intermediarios de la degradación de ácidos grasos, son objeto actualmente de las investigaciones del grupo.

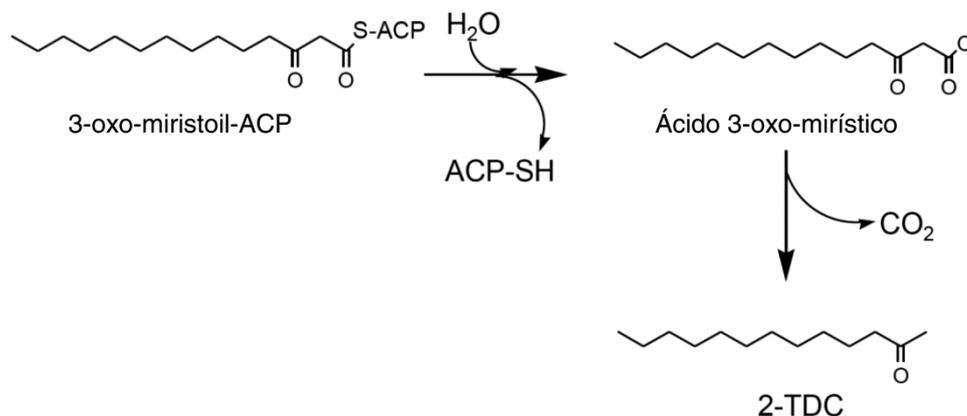


Figura D.1: Hipótesis del origen de la 2-TDC en *S. meliloti fadD*. El 3-oxo-miristoil-ACP se forma como intermediario de la ruta de síntesis de ácidos grasos. El enlace tioéster de este acil-ACP se hidroliza por acción de una teórica tioesterasa liberándose ácido 3-oxo-mirístico, el cual posteriormente sufre una descarboxilación (espontánea o por acción enzimática) para dar 2-TDC.

La 2-TDC dificulta el establecimiento de interacciones planta-bacteria.

Los estudios llevados a cabo en esta Tesis no sólo describen por primera vez el impacto de la 2-TDC en comportamientos bacterianos sino también su efecto en el establecimiento de interacciones planta-bacteria, tanto mutualistas como patogénicas. En el caso de la simbiosis que *S. meliloti* establece con plantas de alfalfa, la aplicación de 2-TDC en etapas tempranas de la interacción provoca un retraso en la aparición de los primeros nódulos, así como una reducción significativa en el número medio de nódulos desarrollados por la planta a lo largo del tiempo, efecto que es dependiente de dosis. Por otro lado, hemos constatado el efecto protector que ejerce la 2-TDC en plantas de tomate frente al desarrollo de la mancha o peca bacteriana, enfermedad causada por la bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. La aplicación de la MK, con un efecto que también es dependiente de dosis, retrasa y reduce la aparición de los síntomas típicos de la enfermedad. En ambas interacciones planta-bacteria, el efecto causado por la 2-TDC se ha relacionado con una menor capacidad de la bacteria de colonizar los tejidos vegetales (colonización de la superficie de la raíz en el caso de *S. meliloti*, o crecimiento bacteriano en el apoplasto foliar en el caso de *P. syringae*). Este efecto, que se correlaciona con la menor capacidad de formar biopelículas en superficies abióticas en presencia de la MK, podría ser la causa del efecto negativo de la 2-TDC en el establecimiento de la asociación planta-bacteria. No obstante, la posibilidad de que la 2-TDC esté siendo reconocida por la planta y desencadene respuestas que interfieran con el proceso colonizador e infectivo de la bacteria no es descartable. En este sentido, se sabe que ciertos VOCs bacterianos pueden desencadenar respuestas en organismos vegetales, incluyendo la puesta en marcha de una resistencia sistémica inducida o ISR (Chung *et al.* 2016; Audrain *et al.* 2015a; Ryu *et al.* 2004). De hecho, aunque no son concluyentes, en este trabajo presentamos algunas evidencias de que la 2-TDC podría ejercer su efecto en el proceso infectivo de la bacteria, actuando a través de la planta. Así, las cinéticas de nodulación realizadas con plantas de alfalfa que fueron pre-tratadas con 2-TDC antes de su inoculación con *S. meliloti*, y en las que la bacteria nunca se puso en contacto con la MK, revelaron una interferencia negativa con el proceso de nodulación. Además, la eficiencia de nodulación en presencia de 2-TDC de mutantes de *S. meliloti* insensibles a la MK identificados en el Capítulo 2, se vio también afectada negativamente. Si el efecto que la 2-TDC ejerce en las interacciones planta-bacteria es consecuencia de un efecto ejercido sobre la bacteria, sobre la planta, o sobre ambos organismos, es un aspecto todavía a investigar, que será objeto de nuestros estudios en el futuro.

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que, además de proteger a las plantas frente al ataque de insectos herbívoros, la 2-TDC puede ejercer un efecto protector frente a enfermedades bacterianas. Puesto que se trata de un compuesto natural que influye en la virulencia de bacterias patógenas sin limitar su crecimiento, la 2-TDC abre la posibilidad del desarrollo de soluciones biotecnológicas para el control de infecciones causadas por estos microorganismos, minimizando el riesgo de generar resistencias. Por todo ello, la identificación de genes implicados en la síntesis, el metabolismo y la transducción de señales de la 2-TDC, así como descifrar los mecanismos específicos a través de los cuales esta MK afecta a las bacterias y a su interacción con la planta, puede contribuir sin duda al desarrollo de nuevas aproximaciones biotecnológicas para el control de las enfermedades.

Genes implicados en el mecanismo de acción de la 2-TDC

Con el fin de identificar determinantes genéticos implicados en el mecanismo de acción de la 2-TDC, se han aislado y analizado un total de 19 transposantes derivados de la cepa GR4 de *S. meliloti* que muestran una movilidad menor a la de la cepa silvestre, o incluso anulada, en presencia de 2-TDC. Doce de esos mutantes (identificados como GRS) se habían seleccionado con anterioridad al inicio de esta Tesis, empleando MM solidificado con agar Pronadisa (MM_{AP}) al 0,6%, condiciones en las que GR4 es incapaz de desplazarse en superficie en ausencia de la MK (Bernabéu-Roda 2014; Soto *et al.* 2002). El resto de transposantes (7, identificados como GTI) se han aislado en este trabajo de Tesis Doctoral, empleando en el escrutinio MM solidificado con agar Noble (MM_{AN}) al 1%, condiciones en las que al igual que en el medio de selección anterior, GR4 tampoco es capaz de desplazarse en superficie en ausencia de la 2-TDC (Bernabéu-Roda *et al.* 2015). No obstante, el AN proporciona condiciones más permisivas para la translocación en superficie de *S. meliloti*, lo que permite la movilidad de GR4 en superficie cuando se adiciona a MM a una concentración de 0,6%. Esta característica ofrecía la ventaja de poder comprobar si los distintos mutantes seleccionados eran defectivos en la respuesta a 2-TDC, en el desplazamiento en superficie en ausencia de la MK, o ambos.

La caracterización genética y fenotípica de estos mutantes ha revelado entre otras observaciones que: i) Todos los mutantes seleccionados en este estudio presentan defectos en mayor o menor grado en movilidad en superficie, como se deduce de su

comportamiento en MM_{AN} (0,6%) en ausencia de la MK. Este hecho podría sugerir que gran parte de los componentes que participan en el mecanismo de acción de la 2-TDC son componentes implicados en desplazamiento bacteriano en superficie; ii) Los genes afectados en los transposantes son muy diversos desde el punto de vista funcional, habiéndose identificado genes que codifican componentes del flagelo (*flhA* y *flgG*), transportadores (*smc01368*, *smc02160* y *smc04454*), un sistema regulador de dos componentes (*ntrYX*), proteínas implicadas en metabolismo lipídico (*sma1398*), proteínas que participan en metabolismo de los segundos mensajeros di-GMPc (*smc03141* y *sma01379*) y ppGpp (*relA*) y genes con función desconocida (*smc00190* y *smc02081*); iii) Sólo los transposantes afectados en 2 de los 12 genes identificados en el estudio resultaron ser completamente insensibles a 2-TDC, acaparando especialmente nuestra atención los afectados en *ntrY* y *smc03141*.

Salvo para el caso del gen *ntrY* que ha sido caracterizado en profundidad en esta Tesis, la confirmación de la relación entre los genes identificados y los fenotipos observados requiere la realización de experimentos adicionales de complementación genética y/o reconstrucción de mutantes por delección.

a) Componentes con función específica en movilidad en superficie.

Aunque, como hemos comentado, todos los genes identificados en el estudio parecen desempeñar algún papel en la movilidad en superficie de *S. meliloti*, sólo dos de ellos son específicos de este tipo de translocación, ya que los correspondientes transposantes mostraron una movilidad tipo *swimming* indistinguible de la mostrada por la cepa parental. Se trata de los genes *smc02160* y *sma1398*, que codifican una teórica permeasa y una proteína anotada como posible deshidrogenasa de alcoholes de cadena corta. Mientras el transposante afectado en la teórica permeasa muestra cierta capacidad de desplazarse en superficie (aproximadamente un tercio de la capacidad de desplazamiento de la cepa parental) y cierta respuesta a 2-TDC en condiciones menos restrictivas (MM_{AN} (0,6%)), el mutante afectado en *sma1398* se comporta como no móvil en MM semisólido y su movilidad en respuesta a 2-TDC es bastante limitada. La proteína de 259 aminoácidos codificada por *sma1398* muestra homología con distintas oxo-acil-ACP reductasas y parece formar operón con al menos otros 3 genes implicados en metabolismo lipídico, algunos de los cuales también podrían verse afectados por un efecto polar causado por la inserción del Tn5. Si el defecto mostrado por el transposante afectado en este operón es consecuencia de defectos en la síntesis de un compuesto de naturaleza lipídica que sea necesario

para la translocación en superficie, requiere de una investigación específica que no ha sido abordada en esta Tesis.

b) Componentes con función en movilidad general.

El resto de genes identificados parecen desempeñar funciones que afectan a la movilidad bacteriana en general, ya que los correspondientes transposantes presentaron distintos grados de afectación de la movilidad tipo *swimming*. Atendiendo a dicho grado de afectación podemos distinguir dos subgrupos:

b1) Los mutantes menos afectados en el movimiento en medio líquido fueron los afectados en los genes *smc01368*, *relA*, *smc03141* y *smc04454*.

- El gen *smc01368*, que codifica un teórico transportador de la familia MFS (Major Facilitator Superfamily), es el que, según nuestros ensayos, tiene un papel más discreto en el control de la movilidad en superficie y en la respuesta a 2-TDC. Sin embargo, curiosamente, hasta tres transposantes aislados de forma independiente en nuestros escrutinios (1 GRS y 2 GTI) resultaron estar afectados en este gen, lo que apoya su participación en la translocación en superficie de *S. meliloti*, aunque el papel específico que desempeña queda por determinar.

- El mutante afectado en *relA* es incapaz de desplazarse en superficie, y la presencia de 2-TDC indujo sólo una tímida respuesta positiva en la translocación. Aunque el mutante tiene un ligero retraso en crecimiento en MM, esto sería insuficiente para explicar la ausencia de desplazamiento en superficie de medio semisólido. RelA junto a DksA participa en la respuesta estricta que se dispara en condiciones de limitación de nutrientes a través de la alarmona ppGpp. Esta molécula se une y altera la capacidad de la ARN polimerasa (RNAP) de iniciar y progresar en la transcripción, además de afectar la afinidad del complejo por distintos factores sigma. En *S. meliloti* RelA es una proteína bifuncional que participa tanto en la síntesis como en la degradación de ppGpp (Krol & Becker 2011). Se ha descrito que un mutante *relA* de *S. meliloti* súper-produce succinoglucano y es defectivo en el establecimiento de simbiosis siendo Nod⁻ Fix⁻ (Wells & Long 2002). Recientemente, se ha descrito que un mutante ppGpp⁰ del patógeno de judía *P. syringae* pv. *syringae* es defectivo en *swarming* y en virulencia (Chatnaparat *et al.* 2015). ppGpp parece regular la movilidad *swarming* en este fitopatógeno a través de distintas vías incluyendo el control de la producción del surfactante syringofactina. Los resultados obtenidos en este trabajo

apuntan a que RelA también podría controlar funciones clave en la movilidad en superficie en *S. meliloti*.

- Un comportamiento parecido al del mutante en *relA*, tanto en movilidad en superficie como en respuesta a 2-TDC, lo muestra el transposante afectado en el teórico transportador ABC, codificado por el gen *smc04454*. Además, aunque en condiciones más permisivas (MM_{AN} (0,6%)) este mutante responde a la MK, cuando se incrementa el porcentaje de agar hasta el 1% la movilidad deja de verse favorecida. El transportador ABC ChvD de *Agrobacterium tumefaciens*, que comparte un alto porcentaje de identidad con Smc04454 (81%), se ha relacionado con la virulencia de esta bacteria. ChvD está implicado en el control de la expresión del regulador de respuesta *virG*, que a su vez activa los genes *vir*. Además de reducir la virulencia de *A. tumefaciens*, la mutación de *chvD* da lugar a retrasos en el crecimiento en medio rico, aunque no en medio mínimo (Liu *et al.* 2001). El mutante en Smc04454 de *S. meliloti* presenta un patrón de crecimiento similar, estando afectado en medio rico (TY) pero no en MM. Teniendo en cuenta el papel que juega el transportador ChvD en la capacidad patogénica de *A. tumefaciens*, sería interesante analizar el fenotipo simbiótico del transposante afectado en Smc04454.

- A diferencia de los dos transposante anteriores, el mutante afectado en *smc03141* además de ser incapaz de desplazarse en superficie no responde a la presencia de 2-TDC en ninguna de las condiciones ensayadas. El gen *smc03141* contiene un dominio EAL típico de enzimas diguanilato fosfodiesterasas, encargadas de degradar di-GMPc (Schirmer & Jenal 2009). En un estudio reciente en el que se han analizado 22 genes relacionados con la síntesis, degradación o unión de di-GMPc, contenidos en el genoma de la cepa Rm2011 de *S. meliloti*, se menciona que el gen adyacente *smc03142* y *smc03141* codifican los extremos N- y C-terminal de una teórica proteína bifuncional que se ha truncado como consecuencia de la existencia de una mutación en el codón 196 que lo convierte en un codón de terminación (Schäper *et al.* 2015). En ese mismo estudio pudieron comprobar que mutantes simples en cada uno de los 22 genes estudiados por su posible relación con di-GMPc, apenas experimentaban cambios en cuanto a la movilidad *swimming*, la producción de EPS, la capacidad de formar biopelículas o la capacidad simbiótica (Schäper *et al.* 2015). En la cepa GR4 de *S. meliloti* utilizada en esta Tesis, no existe la mutación que afecta a la región que engloba los genes *smc03142* y *smc03141* descrita para las cepas Rm2011/Rm1021. Además, el mutante en el que el Tn5 ha inactivado la secuencia de *smc03141* presenta un ligero defecto en movilidad *swimming* y es totalmente defectivo en desplazamiento en superficie y en la respuesta a 2-TDC. Todos estos datos apuntan a que el gen inactivado en GR4, posiblemente implicado en metabolismo de di-GMPc,

es clave en el control de la movilidad en superficie y en el mecanismo de acción de la 2-TDC, por lo que, como ya se ha comentado, centró nuestro interés y su papel está siendo evaluado en profundidad en el grupo de investigación. Además de *smc03141*, en nuestro estudio se identificó otro gen relacionado con el metabolismo del di-GMPc, *sma01379*, el cual codifica una teórica diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa. Sin embargo, decidimos excluir al correspondiente transposante de las investigaciones relacionadas con el objetivo de esta Tesis debido a sus graves problemas de crecimiento en MM.

b2) El resto de los genes identificados en nuestro estudio (*flhA*, *flgG*, *smc00190*, *smc02081*, y *ntrY*), desempeñan funciones básicas y comunes en la movilidad bacteriana, ya que los correspondientes transposantes presentaron defectos severos en la movilidad tipo *swimming*.

•Lógicamente, los transposantes afectados en los genes flagelares *flhA* y *flgG*, no mostraron desplazamiento *swimming* ni *swarming*. El primero tiene afectado uno de los componentes del sistema de secreción tipo 3 (TSS3), y en el segundo la parte afectada sería el cilindro del cuerpo basal del flagelo. Aunque a falta de corroborar la ausencia de flagelos en estas cepas, su comportamiento en movilidad, especialmente en *swimming*, sugiere que se trata de cepas aflageladas. Fue muy llamativo el hecho de que la respuesta de ambos mutantes a 2-TDC fuese muy diferente a la de la cepa GR4 Δ flaAB, también aflagelada por carecer de las flagelinas mayoritarias que componen el filamento flagelar. Mientras los transposantes afectados en *flhA* y *flgG* son casi insensibles a la MK (no incrementan la movilidad en superficie en MM_{AN} (0,6%), y lo hacen muy débilmente en MM_{AN} (1%); Fig. 2.3 y Tabla 2.1), la cepa GR4 Δ flaAB responde claramente y en algunas ocasiones igual que la cepa silvestre. Podríamos deducir de estas observaciones que mutaciones que afectan a componentes del flagelo que se ensamblan en etapas tempranas ocasionan la pérdida casi total de respuesta a 2-TDC por parte de la bacteria. Estos resultados indican que el mecanismo que participa en movilidad en superficie independiente de acción flagelar disparado por la 2-TDC, se co-regula con el estado del ensamblaje del flagelo, viéndose reprimido si no se ha completado una estructura mínima del aparato flagelar.

•Pertenece a este subgrupo encontramos dos genes que codifican proteínas de función desconocida: *smc00190* y *smc02081*. Los dos mutantes presentaron una movilidad *swimming* reducida con respecto a la cepa silvestre, pero mayor que la mostrada por mutantes aflagelados, lo cual sugiere que no carecen totalmente de dichos apéndices. Ambos eran completamente defectivos en movilidad en superficie y se encontraban afectados en su respuesta a 2-TDC. El gen *smc00190* codifica una

proteína de gran tamaño (2089 aa) anotada como teórico quimiorreceptor MCP (del inglés *Methyl-accepting Chemotaxis Protein*). No obstante, un análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica revela que esta proteína no parece tener las características típicas de una MCP, de las que en *S. meliloti* se han identificado un total de 9 (Meier *et al.* 2007). Además de 2 dominios transmembrana en la región N-terminal y un posible dominio MCP, esta gran proteína presenta hasta 6 dominios apolipoproteína y dominios de tipo SMC (del inglés *Structural Maintenance of Chromosomes*), que aparecen en proteínas que se unen a ADN y participan en la organización y segregación de cromosomas en la división de células eucariotas, aunque también se identifican en proteínas de bacterias. La función que Smc00190 desempeña para la biología en general, y la movilidad en particular, de *S. meliloti* está por estudiar. Sin embargo, resultados preliminares obtenidos mediante visualización de las células del transposante al microscopio electrónico de transmisión sugieren que Smc00190 podría tener un papel en el mantenimiento de la estructura celular, ya que éstas presentan una forma de coco y tienen un tamaño muy pequeño. Además, hemos podido constatar que, aunque el transposante es capaz de formar nódulos fijadores de nitrógeno, se encuentra seriamente afectado en su capacidad competitiva por la nodulación de alfalfa, lo cual podría ser consecuencia de su defecto en movilidad en superficie.

Por su parte, la proteína codificada por *smc02081* es una proteína muy conservada en las especies de los géneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Agrobacterium*, que muestra un dominio PopZ (*Pole-Organizing Protein*) que abarcaría prácticamente toda la cadena peptídica (del aa₁₂ al aa₂₅₁). Los extremos N y C-terminal de Smc02081 son los que presentan mayor grado de homología con la proteína PopZ de *A. tumefaciens* (Grangeon *et al.* 2015). PopZ es un factor que organiza la polarización de proteínas que participan en diversos aspectos de la vida bacteriana entre los que se encuentran la quimiotaxis, transducción de señales, ciclo celular, motilidad, morfogénesis o patogénesis (Grangeon *et al.* 2015; Sanselicio *et al.* 2015; Ebersbach *et al.* 2008). En *A. tumefaciens* y *Caulobacter crescentus* se ha demostrado que PopZ, junto con el factor PodJ, son claves en la señalización de los polos celulares durante el proceso de división, de tal forma que se encargan de la correcta organización espacio-temporal tanto de proteínas estructurales como de proteínas reguladoras. En *S. meliloti* la pérdida de función de PodJ1 da lugar a alteraciones en la morfología y el ciclo celular, en el mantenimiento de la integridad de la envuelta, en la producción de exopolisacáridos y en movilidad (Fields *et al.* 2012). Por tanto, atendiendo al fenotipo que muestra el correspondiente transposante, cabe la posibilidad de que el gen

smc02081 participe también, ya sea de forma directa o indirecta, en algunas de estas funciones.

•Finalmente dentro del subgrupo de genes que parecen desempeñar funciones clave en movilidad general, encontramos el gen *ntrY*. Como ya se ha mencionado, sólo los transposantes afectados en *ntrY* y *smc03141*, resultaron ser completamente insensibles a la 2-TDC. A diferencia del mutante afectado en *smc03141*, el transposante afectado en *ntrY* se encontraba mucho más afectado en movilidad *swimming*, y aunque era defectuoso en la translocación en superficie comparado con la cepa GR4, su capacidad de movimiento en medio semisólido fue algo superior a la del mutante en *smc03141*.

Complejo papel regulador del sistema regulador de dos componentes NtrY/NtrX de *S. meliloti* GR4.

Hasta en cinco mutantes seleccionados en el transcurso de este estudio se encontró que el Tn5 interrumpía la secuencia de un gen anotado como *ntrY*, lo cual era indicativo de un papel relevante en el control de la movilidad en superficie en *S. meliloti*. NtrY es una histidina quinasa asociada a membrana que forma parte del sistema regulador de dos componentes (TCS) NtrY/NtrX, donde NtrY es el sensor encargado de fosforilar al regulador de respuesta NtrX. Este sistema, que se ha estudiado en diversas bacterias desde rizobios hasta patógenos de animales, se ha relacionado principalmente con el metabolismo nitrogenado. Recientemente en un estudio llevado a cabo en la cepa Rm1021 de *S. meliloti*, se ha descrito el papel del regulador NtrX, pero no del sensor NtrY, en el control de la movilidad, la producción de succinoglucano (EPS I) y la fijación simbiótica de nitrógeno (Wang *et al.* 2013).

Los datos obtenidos de la caracterización de uno de los transposantes derivados de GR4 y afectado en *ntrY* (GRS577) demuestran que tanto NtrY como NtrX actúan conjuntamente en la regulación de fenotipos importantes para esta bacteria. Ambos genes son necesarios para la máxima expresión de genes flagelares, el control de la producción de succinoglucano (EPS I), el mantenimiento de la integridad de la envuelta celular, para la tolerancia frente a estrés salino, así como para una eficiente colonización de la raíz y capacidad competitiva por la ocupación de los nódulos. Además, aunque NtrY/NtrX no es esencial para el establecimiento de una simbiosis fijadora de nitrógeno en alfalfa, este sistema permite la expresión óptima de genes que participan en el metabolismo del nitrógeno, tales como *nifA* y genes de desnitrificación, en condiciones microaeróbicas.

Algunos de los resultados obtenidos en nuestros estudios son significativamente diferentes de los mostrados recientemente por el grupo de Wang y colaboradores en relación al papel del sistema NtrY/NtrX en la cepa Rm1021 de *S. meliloti* (Wang *et al.* 2013). Estos investigadores sugieren que en Rm1021 el regulador NtrX, pero no la histidina quinasa NtrY, está implicado en el control de la movilidad, la producción de EPS I y la fijación simbiótica de nitrógeno. La delección del gen *ntrX* parece ser letal en dicha bacteria, por lo que los resultados mostrados en el trabajo de Wang y colaboradores se obtuvieron empleando un mutante por inserción de un plásmido, que no anulaba completamente la expresión de *ntrX* pero sí la disminuía. En el caso del transposante GRS577, la inserción del Tn5 interrumpe la secuencia codificante del gen *ntrY* y también provoca una disminución en la expresión de *ntrX* con respecto a la cepa parental GR4. Esta disminución en los niveles de transcritos de *ntrX* es similar a la detectada para el mutante por inserción derivado de Rm1021 (un 10 y un 14% de la actividad transcripcional de *ntrX* detectada en GR4 y Rm1021, respectivamente).

Mediante la utilización de un plásmido que portaba el gen *ntrX* bajo el control del promotor *lac*, Wang y colaboradores pudieron restaurar la producción de EPS I y el fenotipo simbiótico de su mutante por inserción en *ntrX*. En nuestro caso, el empleo de la construcción plasmídica pJB3-*ntrX*, que también permite la expresión de dicho gen desde un promotor *lac* (verificado mediante análisis por RT-qPCR), no fue suficiente para complementar los fenotipos de GRS577, lo que concuerda con el papel propuesto para *ntrY* en el control de los mismos. Del mismo modo, tampoco la construcción pJB3-*ntrY* pudo complementar la mutación en GRS577. Únicamente la expresión conjunta de *ntrY* y *ntrX* en el plásmido pJB3-*ntrYX* restauró los fenotipos exhibidos por el transposante. Estos resultados indican que ambos genes participan en el control de los diferentes fenotipos observados en GRS577.

De acuerdo con Wang y colaboradores (2013) *ntrY* no es esencial para la viabilidad de Rm1021 y un mutante por delección en dicho gen se comporta como la cepa silvestre. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales y utilizando técnicas estándar para el intercambio alélico, sólo se pudo obtener la delección de *ntrY*, tanto en GR4 como en Rm1021, en presencia de la construcción pJB3-*ntrYX*, resultados que sugieren la esencialidad del gen en ambas cepas. Experimentos de hibridación de ADN con una sonda específica revelaron que, en ausencia de dicha construcción, algunas colonias resultantes tras el proceso de doble recombinación contenían reordenamientos inesperados que afectaban a las secuencias de *ntrY*. Estos reordenamientos podrían haber escapado a los análisis de comprobación del mutante por delección en *ntrY* de Wang y colaboradores, ya que dicho mutante se comprobó únicamente por PCR. Curiosamente, los intentos de obtener mutantes por delección en

ntrY y *ntrX* en *Azospirillum brasilense* mediante eventos de doble recombinación también fueron infructuosos (Ishida *et al.* 2002). Aunque en los estudios con esa bacteria se obtuvieron potenciales candidatos, los análisis de hibridación revelaron que el cassette empleado como marcador se había insertado en un sitio distinto al gen *ntrY*. Teniendo en cuenta estos resultados y los obtenidos en nuestros intentos de deleccionar *ntrY* en *S. meliloti*, cabe la posibilidad de que el gen *ntrY* siga estando presente en el mutante en Rm1021. Desafortunadamente, no hemos podido testar con nuestras condiciones experimentales las construcciones publicadas por Wang y colaboradores. Nuestros resultados indican que la deleción de *ntrY* de algún modo compromete la viabilidad celular en *S. meliloti*.

En cuanto al control de los fenotipos mostrados por el mutante GRS577, hemos comprobado que la menor expresión de los genes *visNR* y la sobre-expresión de los genes *exo* son responsables de su defecto en movilidad mediada por flagelos y la mayor producción de EPS I. Además, en comparación a la cepa silvestre el mutante exhibía mayor capacidad para formar biopelículas en superficie de vidrio, un comportamiento que viene derivado de la súper-producción del exopolisacárido, como se demostró al analizar la adhesión a dicha superficie de un doble mutante *exoY ntrY::Tn5*. Esa misma cepa seguía mostrándose prácticamente insensible a la presencia de 2-TDC, lo cual descarta que el exceso de EPS I esté dificultando la percepción o la respuesta a la MK.

También el transposante muestra mayor sensibilidad a la presencia de sal en el medio de cultivo, un fenotipo que también se había descrito para un mutante en *ntrY* de la bacteria simbiote de judía *Rhizobium tropici* (Nogales *et al.* 2002). Por otro lado, la morfología alterada que muestra GRS577 y su mayor sensibilidad a la presencia de compuestos que afectan la integridad de membranas sugieren que el sistema NtrY/NtrX podría participar en el mantenimiento de la integridad de la envuelta celular. De acuerdo con esta idea, el perfil de expresión global del mutante obtenido mediante una aproximación transcriptómica, reveló la expresión diferencial de genes que teóricamente codifican componentes estructurales de la envuelta celular y enzimas implicadas en la modificación de la pared. Cabe la posibilidad de que estos defectos a nivel de envuelta tengan relación con que el mutante no sea capaz de estimular su capacidad de desplazarse en presencia de la 2-TDC. Por lo tanto, el sistema NtrY/NtrX pasaría a formar parte del grupo de proteínas reguladoras que en *S. meliloti* controlan de manera coordinada procesos celulares críticos como son la movilidad, la producción de EPS y la viabilidad en condiciones de vida libre. Dicho grupo estaría integrado por los reguladores Emm, ExoR-ExoS/ChvI o CbrA y por el factor

determinante de la polaridad PodJ (Fields *et al.* 2012; Wang *et al.* 2010; Morris & González 2009; Gibson *et al.* 2007). Aunque en este trabajo no se ha investigado en mayor profundidad sobre una posible interacción entre los sistemas NtrY/NtrX y ExoS/ChvI hay que mencionar que la expresión del gen *chvI* estaba incrementada en el mutante GRS577 en comparación a la cepa silvestre GR4.

Con respecto al fenotipo simbiótico, nuestros resultados indican curiosamente que GRS577 es capaz de establecer una interacción simbiótica con alfalfa de forma tan eficiente como la cepa silvestre. En cambio, el mutante por inserción en *ntrX* de Rm1021 mostró defectos en fijación simbiótica de nitrógeno, a pesar de que la expresión de los genes *nifA* y *nifH* no estaba afectada en este mutante (Wang *et al.* 2013). Estas diferencias podrían explicarse por el tipo de mutación que cada una de las cepas contiene. Cabe la posibilidad de que el gen *ntrX* en el fondo GRS577 se esté expresando desde un promotor interno del Tn5 (esta construcción carece de secuencias terminadoras de la transcripción), y que el nivel de transcritos de dicho gen sea suficiente para conseguir llevar a cabo una fijación de nitrógeno eficiente. Otra posible explicación es que la disrupción del normal funcionamiento de uno o de los dos componentes del sistema NtrY/NtrX de lugar a diferentes fenotipos. Este efecto, que podría ser el resultado de una regulación cruzada entre NtrY/NtrX y el TCS situado aguas arriba NtrB/NtrC, se ha descrito en *Azorhizobium caulinodans* (Pawlowski *et al.* 1991). En esta bacteria, que es capaz de fijar nitrógeno en vida libre, el proceso de fijación se ve más severamente afectado cuando se elimina una de las proteínas activadoras (NtrC o NtrX) que cuando se elimina el sistema NtrY/NtrX completo. En cualquier caso, para resolver estas discrepancias sería conveniente una evaluación más profunda a nivel genético del mutante por inserción plasmídica derivado de Rm1021, puesto que según la estrategia empleada para su obtención no está claro que su genotipo se corresponda con el que describen Wang y colaboradores (2013).

No existen muchos datos en la literatura acerca de la regulación transcripcional de los genes *ntrY* y *ntrX*. En *A. caulinodans*, la expresión de estos genes es dependiente de *ntrC* cuando las células crecen en presencia de nitrato (Pawlowski *et al.* 1991). En *Rhodobacter capsulatus* y *Brucella abortus* la transcripción de *ntrY* comienza en la región intergénica *ntrC-ntrY*, pero también existe un promotor aguas arriba de los genes *nifR-ntrB-ntrC* que puede dirigir la transcripción de *ntrY* (Carrica *et al.* 2012; Drepper *et al.* 2006). Hasta donde sabemos, no hay evidencias que apunten a que en *S. meliloti* *ntrYX* se puedan transcribir desde un promotor aguas arriba de *dusB-ntrB-ntrC*. Un estudio en el que se mapearon todos los sitios de inicio de la transcripción (TSS) en el genoma de *S. meliloti* no reveló la existencia de ningún TSS aguas arriba de los genes *dusB-ntrB-ntrC*, aunque sí se mapearon posibles TSS aguas arriba del

en alfalfa. Este hecho podría deberse a un posible efecto directo de la 2-TDC sobre la planta, pero tampoco se puede descartar que la MK afecte fenotipos bacterianos importantes para la simbiosis más allá de la movilidad y que aún desconozcamos.

Los análisis de expresión génica realizados en este trabajo indican que en *S. meliloti* el sistema NtrY/NtrX participa en la regulación fina de la expresión de genes del metabolismo del nitrógeno en respuesta a condiciones ambientales específicas. En microaerobiosis (2% O₂) y ausencia de nitrato, este sistema permite que haya una expresión máxima del gen *nifA*, mientras que la máxima expresión de genes de desnitrificación requiere la presencia de nitrato. El efecto negativo del nitrato en la expresión de *nifA* en *S. meliloti* crecido en vida libre en microaerobiosis ya se había descrito previamente (Fischer 1994; Noonan *et al.* 1992); sin embargo, ésta es la primera vez que se asocia al sistema NtrY/NtrX con este efecto. De igual modo, se sabía que la presencia de nitrato en condiciones de crecimiento en microaerobiosis puede activar la expresión de genes de desnitrificación en dicha bacteria (Torres *et al.* 2014). Nuestros estudios establecen una conexión del sistema NtrY/NtrX con dicho proceso. Curiosamente, el análisis transcriptómico del mutante GRS577 reveló además la represión de varios genes *fixNOQP* que codifican la citocromo c oxidasa (cbb₃) de alta afinidad por O₂ (Torres *et al.* 2013; Bobik *et al.* 2006). Este papel regulador de la expresión de enzimas implicadas en la respiración de nitrógeno y de citocromo oxidasa de alta afinidad se ha descrito también para el sistema NtrY/NtrX de los patógenos *Brucella* y *Neisseria* (Atack *et al.* 2013; Carrica *et al.* 2013; 2012). Al igual que ocurre en estas bacterias, el sistema NtrY/NtrX de *S. meliloti* puede contribuir, junto con otros TCS tales como ActSR (Fenner *et al.* 2004), en la adaptación a las condiciones microóxicas que se dan en el interior del nódulo durante la interacción simbiótica.

En resumen, la caracterización fenotípica del transposante GRS577 ha servido para desvelar el complejo papel regulador del sistema NtrY/NtrX en el control de ciertos fenotipos relevantes tanto para el estado de crecimiento en vida libre como para la interacción simbiótica de *S. meliloti*. La tensión de oxígeno y la presencia de nitrato, señales químicas probablemente detectadas por el sensor NtrY, modulan dicho papel regulador. En condiciones de vida libre, el sistema contribuye a la tolerancia frente al exceso de sal y a mantener la integridad de la envuelta celular, además de ser responsable de regular positivamente la movilidad y de reprimir la producción de succinoglucano y el establecimiento de biopelículas. Esto permite al rizobio llevar a cabo una colonización eficiente de las raíces de alfalfa y a competir de forma óptima

por la ocupación de los nódulos. Aunque el sistema NtrY/NtrX no es indispensable para que la bacteria induzca la formación de nódulos y pueda fijar nitrógeno dentro de ellos una vez establecida la simbiosis, sí contribuye al metabolismo energético cuando las células se encuentran con el ambiente microaeróbico de los mismos, induciendo citocromo oxidasa de alta afinidad y modulando la expresión de la maquinaria enzimática para la respiración y la fijación de nitrógeno.

Identificación y caracterización de una bomba de extrusión RND inducida por 2-TDC.

Con objeto de identificar el mecanismo de acción de la 2-TDC en *S. meliloti*, previo a este trabajo de Tesis Doctoral se realizó en el grupo de investigación un análisis transcriptómico de Rm1021 en respuesta a 2-TDC. Los resultados de esos análisis mostraron que la 2-TDC parece inducir algún tipo de estrés en las células, ya que aparecieron sobre-expresados genes relacionados con procesos de oxidorreducción y genes relacionados con la resistencia a agentes antimicrobianos, al mismo tiempo que se reprimía la expresión de genes implicados en la captación y el metabolismo del hierro (Bernabéu-Roda 2014). Sin embargo, estos datos no ayudaban a encontrar una explicación fácil a cómo la 2-TDC era capaz de estimular la translocación en superficie. Por ello, además de la aproximación genética basada en la búsqueda de mutantes de *S. meliloti* que no se moviesen en respuesta a 2-TDC, se abordó la identificación de genes de *S. meliloti* GR4 cuya expresión se viese alterada significativamente en presencia de la MK utilizando la tecnología de las trampas génicas. La cepa GR4 se sometió a una mutagénesis generalizada con un transposón Tn5 modificado, el cual contenía el operón *luxCDABE* que codifica el enzima luciferasa. Dicho operón nos serviría como construcción reportera para monitorizar la expresión en presencia o ausencia de 2-TDC del gen afectado por la inserción del transposón a través de la medición de la intensidad lumínica emitida por el correspondiente mutante. Siguiendo esta estrategia, hemos identificado dos genes, *smb20342* y *smb20345*, cuya expresión se activa en presencia de 2-TDC. Se trata de dos secuencias codificantes situadas muy próximas en el plásmido simbiótico pSymB, que forman parte de dos teóricos operones: *smb20343-smb20342* y *smb20347-smb20346-smb20345* (Schlüter *et al.* 2013).

Los genes *smb20343-smb20342* aparecieron como inducidos por la 2-TDC en el transcriptoma de Rm1021 (Bernabéu-Roda 2014). *Smb20343* y *Smb20342* constituyen

las subunidades alfa y beta de una teórica isoquinolina 1-oxidoreductasa (lor), una enzima de la familia xantina oxidasa con clusters Fe-S, que cataliza la hidroxilación de isoquinolina a 1-oxo-1,2-dihidroisoquinolina con la consiguiente reducción de un aceptor de electrones (Lehmann *et al.* 1995). La isoquinolina es un alcaloide natural con actividad antibacteriana (Cushnie *et al.* 2014). La inducción de genes que parecen codificar una actividad lor podría sugerir que la 2-TDC esté activando mecanismos de resistencia frente a compuestos con actividad antimicrobiana, función asignada a varios volátiles bacterianos (Audrain *et al.* 2015a).

El mutante afectado en *smb20345*, GTR3033, fue el que mostró mayor nivel de inducción en presencia de 2-TDC. El operón formado por dicho gen y *smb20347-smb20346* codifica dos de los componentes de una teórica bomba de extrusión de resistencia a multidroga (MDR, del inglés *MultiDrug Resistance*) de la familia RND (*Resistance, Nodulation, Division*), y su posible regulador transcripcional. Las bombas RND son sistemas multicomponente constituidos por un transportador de membrana interna (RND), una proteína de fusión de membrana (MFP, del inglés *Membrane Fusion Protein*), y un componente de membrana externa (OMF, del inglés *Outer Membrane Factor*). Los genes *smb20346-smb20345* codifican dos de los componentes estructurales de la bomba RND (MFP y RND, respectivamente), y *smb20347* codifica un teórico regulador TetR que potencialmente podría controlar la expresión de la bomba. En *S. meliloti*, el componente de membrana externa del sistema podría ser TolC, proteína codificada por un gen cromosómico (*smc02082*). Generalmente, los reguladores tipo TetR actúan como represores en condiciones control, y sólo permiten la transcripción de los genes que codifican la bomba tras la unión con su correspondiente sustrato (Cuthbertson & Nodwell 2013). Las bombas RND se encargan de transportar una gran variedad de compuestos, en muchos casos muy diferentes químicamente. Aunque el principal interés en el estudio de estas bombas reside en su papel como agentes inductores de resistencias múltiples frente a compuestos antimicrobianos, estos transportadores también se han implicado en procesos de señalización en bacterias mediando el transporte de moléculas señal y otros metabolitos secundarios, y también son importantes para la virulencia de ciertos patógenos (Alcalde-Rico *et al.* 2016; Xu *et al.* 2016; Blair & Piddock 2009). En *S. meliloti* Rm1021 se han identificado 14 teóricas bombas multicomponente de resistencia a multidroga (MDR) de las cuales 10 pertenecen a la familia RND (Eda *et al.* 2011), siendo una de ellas la identificada en este estudio. Se ha descrito que la pérdida de función de TolC en *S. meliloti* da lugar a un fenotipo pleiotrópico, probablemente por hallarse comprometida la integridad de la envoltura celular: alta

sensibilidad a diversos compuestos tóxicos (antibióticos, detergentes, compuestos derivados de la planta), alta sensibilidad a estrés osmótico y oxidativo, menor producción de succinoglucano, mayor movilidad *swarming*, e incapacidad de inducir la formación de nódulos en plantas de alfalfa (Santos *et al.* 2010; Cosme *et al.* 2008). Sin embargo, tan sólo la bomba SmeAB, codificada por los genes *smc02868-smc02867*, parece desempeñar un papel importante en la extrusión de sustancias tóxicas en *S. meliloti*, así como en la capacidad competitiva por la nodulación (Eda *et al.* 2011). Particular mención merece el caso de la bomba multicomponente de la familia *Major Facilitator Superfamily* (MFS) EmrAB, codificada por los genes *smc03168* y *smc03167*, respectivamente. Los genes de esta bomba se inducen notablemente en respuesta a flavonoides a través de EmrR, un regulador transcripcional tipo TetR, codificado por un gen adyacente (*smc03169*) que se transcribe en sentido contrario (Rossbach *et al.* 2014; Capela *et al.* 2005). Mientras la delección de la bomba no causa fenotipos diferenciables de la cepa silvestre, la delección de EmrR provoca un fenotipo pleiotrópico en el que destacan la producción incrementada de EPS I, menor motilidad y formación de biofilm, así como defectos en el establecimiento de simbiosis con plantas de alfalfa, induciendo pocos nódulos deficientes en fijación de nitrógeno (Santos *et al.* 2014; Rossbach *et al.* 2014). Se piensa que EmrR controla una red reguladora que afecta a componentes de la envoltura celular, preparándola para la colonización de la planta hospedadora. Curiosamente, en el transcriptoma realizado con la cepa Rm1021 los genes que codifican EmrA y EmrR aparecían inducidos en presencia de 2-TDC; por su parte, los genes codificantes de la bomba SmeAB aparecían reprimidos en las mismas condiciones (Bernabéu-Roda 2014).

Los estudios realizados tras el aislamiento y caracterización genética de los transposantes GTR se han centrado en la cepa GTR3033, con el objetivo de intentar comprender qué papel juega la bomba RND afectada en el mecanismo de acción de la 2-TDC. Nuestros datos indican que esta bomba podría estar implicada en el transporte de 2-TDC y otras moléculas señal.

Mediante análisis de expresión génica utilizando fusiones traduccionales hemos determinado que la región promotora que controla la transcripción de la bomba se encuentra aguas arriba del gen *smb20347*. Como se muestra en la Figura D.3, aguas arriba del ATG inicial de *smb20347* existen secuencias palindrómicas que podrían ser reconocidas por el regulador TetR para el control de la expresión del operón de la bomba. Aplicando 2-TDC volátil en células crecidas en superficie de medio semisólido, dicha región promotora se activa únicamente en el transposante, ya que la expresión en la cepa parental se mantiene igual en presencia o ausencia de la MK. Hemos

comprobado que en el mutante dicha expresión está modulada por la cantidad de MK aplicada, y a su vez está influenciada por el modo de crecimiento del mismo, es decir, dependiendo de si crece en medio líquido o sobre la superficie de medio semisólido. Así, la expresión de la bomba en células procedentes de cultivo líquido se incrementa paulatinamente con la concentración de 2-TDC alcanzándose el máximo con 50 μM ; a partir de esa concentración el nivel de inducción decae progresivamente. En cambio, en células crecidas sobre superficie la respuesta de la bomba no disminuye con concentraciones de 2-TDC por encima de 50 μM . También esta respuesta en función de la dosis se observa cuando se aplica 2-TDC como volátil. El modo de aplicación y la concentración pueden influir en la solubilidad de la MK y por tanto en la disponibilidad de la misma para unirse al regulador de la bomba. Pensamos que en el caso de la cepa silvestre GR4, la cual tiene la bomba activa, la aplicación de 1 μmol de la MK puede no ser suficiente para observar la inducción de la misma, ya que podría estar consiguiendo expulsar la molécula aun con niveles de expresión basales de la bomba. En el mutante, en cambio, la interrupción del flujo puede dar lugar a un aumento en los niveles intracelulares de 2-TDC, lo que provocaría una mayor liberación del represor TetR con el consiguiente aumento en la expresión del operón. En esta hipótesis se continúa trabajando actualmente.

```

GTCTTGCCCG CCTCGCTCAC TTCGACATGG CGCACGTCGA AACGCGAGCC
TTTGAGGTTC TTGGCCAGGC GGCAGCCCAT CTTCCCGCCG GCGCCGAACA
GGGCAATCGA TGTCATTTGC AACTCCTCAG CTATCTTGAT GATCCGAATA
GCGGAACTGG TATGATGAGT CAATGAGTAT ATCACCGACT CGCAGTTCGC
CGATTAGCTG GCGACCGCAA ACAGGGTCGG CGGTTGACAA GTCACGATTA
TCGGATTACG ACTGACGGAA TTCAAATTC GTCACTCATC ATCAGGAGAC
AGGATG
smb20347

```

Figura D.3: Posibles sitios de reconocimiento y unión de Smb20347 (TetR) en la región promotora de la teórica bomba RND de *S. meliloti* GR4. Las zonas marcadas con un rectángulo contienen secuencias palindrómicas que podrían ser teóricas dianas del regulador transcripcional Smb20347. Los asteriscos indican el primer nucleótido de dos sitios de inicio de la transcripción identificados por Schlüter y colaboradores (2013). Los nucleótidos marcados en rojo podrían corresponder con sitios de reconocimiento de la ARN polimerasa.

Los análisis de expresión en presencia de otros compuestos alifáticos han revelado la importancia de las características estructurales en la activación de la bomba RND. Cetonas alifáticas y aldehídos de naturaleza volátil fueron los que indujeron más la expresión de la bomba. En el caso de las cetonas, de forma parecida a lo que se observa en la inducción de la movilidad, la posición del grupo carbonilo y la longitud de cadena son factores que influyen en la actividad de la molécula. Curiosamente, la expresión de la bomba también se activa en presencia de AHL, pero lo hace de forma específica con aquellas que contienen una cadena lateral larga con un sustituyente carbonilo en el C3 de dicha cadena, es decir, cadenas muy similares estructuralmente a las MK. Los ensayos de expresión realizados en presencia de antibióticos sugieren que esta bomba no está implicada en el transporte de este tipo de compuestos. Aunque es necesario seguir investigando en mayor profundidad, los resultados obtenidos de estos análisis apuntan a que esta bomba participaría en el transporte de moléculas señal, entre las que se incluirían moléculas de QS AHL.

Sin afectar al crecimiento de *S. meliloti* en presencia o ausencia de 2-TDC ni a su capacidad para desplazarse en superficie o mediante motilidad *swimming*, la inserción del transposón Tn5 en el gen *smb20345* da lugar a una menor respuesta a la 2-TDC, medida en términos de expansión de la colonia en medio semisólido. Esta ausencia de efecto promotor se ve especialmente en las primeras horas de incubación con la MK, y es más pronunciada cuando la bacteria crece en un medio más restrictivo para la movilidad (agar al 1%). En cambio, la capacidad simbiótica de la bacteria no se ve alterada por la mutación en la bomba, ya que el transposante GTR3033 es capaz de inducir la formación de nódulos, así como también, de competir por la ocupación de los mismos de forma tan eficiente como la cepa silvestre. Tampoco su aparente insensibilidad a 2-TDC produce ningún efecto en la nodulación en presencia de dicho compuesto, de forma que plantas de alfalfa inoculadas con el mutante en la bomba siguen experimentando el mismo retraso que las inoculadas con la cepa silvestre GR4 si se adiciona la MK. Una vez más, al igual que ocurre con el transposante GRS577, una cepa insensible a 2-TDC y que en condiciones control es capaz de llevar a cabo un proceso de infección eficiente, sigue mostrando retrasos en nodulación en presencia de dicha MK.

Aunque todos los resultados mostrados se han basado en el empleo del transposante GTR3033, en ensayos de expresión en respuesta a 2-TDC de un mutante obtenido por inserción de una construcción derivada del plásmido pK18*mob* se obtuvieron resultados muy similares a los obtenidos con GTR3033. Además, la

expresión *en trans* del gen *smb20345* restauró los niveles de inducción de la bomba del mutante *smb20345::pK18mob* a valores similares a los mostrados por la cepa parental. Actualmente, se ha conseguido obtener la delección sin marcador tanto en el gen *smb20345* como en el gen que codifica el regulador TetR (*smb20347*) y se continúa trabajando con estas cepas para corroborar los fenotipos observados en el transposante GTR3033. Quizás, al igual que le ocurre a un mutante deficiente en el regulador EmrR (Santos *et al.* 2014; Rossbach *et al.* 2014), un mutante en *smb20347* tenga fenotipos relevantes que puedan dar información sobre el mecanismo de acción de 2-TDC, entre otras moléculas señalizadoras.

Gracias a los análisis realizados con el transposante GTR3033 hemos identificado un operón cuya expresión se activa en presencia de moléculas que actúan como señales químicas que juegan un papel en la comunicación no sólo entre bacterias sino también entre bacterias y sus posibles hospedadores eucariotas. Este hallazgo abre las puertas al diseño de un biosensor que se podría utilizar para medir *in situ* la presencia de dichas moléculas señal y ayudaría a comprender mejor cuál es el papel de éstas en la ecología microbiana.

CONCLUSIONS

- 1- 2-TDC, a volatile methylketone produced by a wide variety of organisms, is a signal molecule in bacteria that might play an important role in both interspecific and interkingdom communication. Without altering bacterial growth, 2-TDC affects bacterial surface translocation and hinders biofilm formation not only in *S. meliloti*, but also in phylogenetically distant bacteria including plant and animal pathogens.
- 2- 2-TDC impairs the establishment of plant-bacteria interactions, both mutualistic and pathogenic. In the case of the symbiosis between *S. meliloti* and alfalfa, the application of 2-TDC leads to a delay in the appearance of the first nodules and to a significant reduction in the number of nodules formed per plant, an effect that is dose-dependent. 2-TDC negatively interferes with the bacterial ability to efficiently colonize plant roots. This effect, which could be the result of 2-TDC altering bacterial behaviours, plant responses, or both, might account for the interference exerted by the methylketone on the *Rhizobium*-legume symbiosis.
- 3- *S. meliloti* GR4 produces volatile 2-TDC upon growth on semisolid surfaces. FadD, a long-chain fatty acyl-CoA ligase, contributes to regulate the 2-TDC levels produced by this bacterium.
- 4- Structural features of 2-TDC, such as the acyl chain length and, especially, the position of the carbonyl group within the molecule, influence its biological activity as determined by surface motility induction in the model bacterium *S. meliloti*. This fact, together with the competitive interaction observed between 2-TDC and an inactive aliphatic ketone, suggest the existence of specific receptor-mediated recognition.
- 5- In *S. meliloti*, the application of 2-TDC does not alter the expression of *quorum sensing*-related genes, which are known to play a role in the control of swarming motility and biofilm formation in different bacteria. Nevertheless, the presence of the methylketone provokes the accumulation of *N*-Acyl-Homoserine-Lactones (AHL) in the alfalfa symbiont. This accumulation, which is not caused by an increase in AHL synthesis, might account for some of the effects caused by 2-TDC.
- 6- The genetic approach pursued in this work aimed at identifying determinants involved in the mechanism of action of 2-TDC, revealed the participation of functionally diverse genes, all of which are important for *S. meliloti* surface

translocation. Thus, genes related to a two-component regulatory system, transport, metabolism of the secondary messengers c-di-GMP and ppGpp, lipid metabolism, flagellar components, as well as genes of yet unknown function, were identified. Of these, the NtrY/NtrX regulatory system and a protein homolog to Smc03141 are key elements in the mechanism of action of the methylketone as revealed by the 2-TDC-insensitivity shown by the corresponding mutants.

- 7- The different behaviour in response to 2-TDC exhibited by non-flagellated variants of GR4 (*flaAflaB* vs. *flgG* or *flhA* mutants) reveals the existence of mechanisms required for *S. meliloti* surface migration which are co-ordinated with the stage of flagellar assembly and which also participate in the mode of action of 2-TDC.
- 8- The NtrY/NtrX two-component system, besides being crucial for the mechanism of action of 2-TDC, plays a complex regulatory role in the biology of *S. meliloti*, by controlling traits relevant for both the free-living and symbiotic lifestyles of this bacterium. Under free-living conditions, this system contributes to salt tolerance and to maintain cell envelope integrity. Moreover, it is responsible for increased bacterial motility and repression of succinoglycan (EPS I) production and biofilm formation. This allows rhizobial cells to achieve efficient root colonization and optimal nodulation competitive ability. Although the NtrY/NtrX system is dispensable for symbiotic nitrogen fixation, it contributes to microaerobic energy metabolism, by inducing high-affinity cytochrome oxidases and fine tuning nitrogen respiration and fixation enzymes in response to partial oxygen tension and the presence of combined nitrogen sources.
- 9- The expression of an operon potentially coding for two components of a multidrug-resistance efflux pump belonging to the RND family and located in the pSymB plasmid, is activated by 2-TDC in a dose-dependent manner. Several methylketones, aldehydes and AHL with structural similarities to 2-TDC, can also modulate the expression of the RND pump, which suggests that it might participate in the transport of signal molecules. The pump is required for increased surface motility of *S. meliloti* in response to volatile 2-TDC, but does not influence its symbiotic properties.

10- The identification of an efflux pump that responds to chemical compounds involved in bacterial signalling (aliphatic ketones, AHL) offers the possibility to design a biosensor which could be used to detect these types of molecules in different biological systems. This tool might contribute to gain insights about the role played by these chemical signals in plant-bacteria interactions.

BIBLIOGRAFÍA

- Abràmoff M.D., Magalhães P.J. & Ram S.J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International* **11**, 36-42.
- Alcalde-Rico M., Hernando-Amado S., Blanco P. & Martínez J.L. (2016) Multidrug efflux pumps at the crossroad between antibiotic resistance and bacterial virulence. *Front Microbiol* **7**, 1483.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & D.J. L. (1990) Basic local alignment search tool. *J Bacteriol* **215**, 403-10.
- Amaya-Gómez C.V. (2013) Transcriptomic approach for the identification of genes and signals playing a role in swarming motility of *Sinorhizobium meliloti*. Connection with biofilm formation and symbiosis. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Amaya-Gómez C.V., Hirsch A.M. & Soto M.J. (2015) Biofilm formation assessment in *Sinorhizobium meliloti* reveals interlinked control with surface motility. *BMC Microbiol* **15**, 58.
- Ames P. & Bergman K. (1981) Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **148**, 728-908.
- An S., Wu J. & Zhang L.H. (2010) Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-Di-GMP phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain. *Appl Environ Microbiol* **76**, 8160-73.
- Anderson J.K., Smith T.G. & Hoover T.R. (2010) Sense and sensibility: flagellum-mediated gene regulation. *Trends Microbiol* **18**, 30-7.
- Anes J., McCusker M.P., Fanning S. & Martins M. (2015) The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* **6**, 587.
- Antonious G.F. (2013) 2-undecanone and 2-tridecanone in field-grown onion. *J Environ Sci Health B* **48**, 302-7.
- Antonious G.F., Dahlman D.L. & Hawkins L.M. (2003) Insecticidal and acaricidal performance of methyl ketones in wild tomato leaves. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* **71**, 400-7.
- Atack J.M., Srikhanta Y.N., Djoko K.Y., Welch J.P., Hasri N.H., Steichen C.T., Vanden Hoven R.N., Grimmond S.M., Othman D.S., Kappler U., Apicella M.A., Jennings M.P., Edwards J.L. & McEwan A.G. (2013) Characterization of an ntrX mutant of *Neisseria gonorrhoeae* reveals a response regulator that controls expression of respiratory enzymes in oxidase-positive proteobacteria. *J Bacteriol* **195**, 2632-41.
- Audrain B., Farag M.A., Ryu C.M. & Ghigo J.M. (2015a) Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiol Rev* **39**, 222-33.
- Audrain B., Letoffe S. & Ghigo J.M. (2015b) Airborne bacterial interactions: functions out of thin air? *Front Microbiol* **6**, 1476.

- Bahlawane C., McIntosh M., Krol E. & Becker A. (2008) Sinorhizobium meliloti regulator MucR couples exopolysaccharide synthesis and motility. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1498-509.
- Banin E., Vasil M.L. & Greenberg E.P. (2005) Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11076-81.
- Barber C.E., Tang J.L., Feng J.X., Pan M.Q., Wilson T.J.G., Slater H., Dow J.M., Williams P. & Daniels M.J. (1997) A novel regulatory system required for pathogenicity of *Xanthomonas campestris* is mediated by a small diffusible signal molecule. *Mol Microbiol* **24**, 555-66.
- Barnett M.J., Fisher R.F., Jones T., Komp C., Abola A.P., Barloy-Hubler F., Bowser L., Capela D., Galibert F., Gouzy J., Gurjal M., Hong A., Huizar L., Hyman R.W., Kahn D., Kahn M.L., Kalman S., Keating D.H., Palm C., Peck M.C., Surzycki R., Wells D.H., Yeh K.C., Davis R.W., Federspiel N.A. & Long S.R. (2001) Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9883-8.
- Barraud N., Storey M.V., Moore Z.P., Webb J.S., Rice S.A. & Kjelleberg S. (2009) Nitric oxide-mediated dispersal in single- and multi-species biofilms of clinically and industrially relevant microorganisms. *Microb Biotechnol* **2**, 370-8.
- Becker A., Bergès H., Krol E., Bruand C., Rüberg S., Capela D., Lauber E., Meilhoc E., Ampe F., de Bruijn F.J., Fourment J., Francez-Charlot A., Kahn D., Küster H., Liebe C., Pühler A., Weidner S. & Batut J. (2004) Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 292-303.
- Belas R. & Suvanasthi R. (2005) The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. *J Bacteriol* **187**, 6789-803.
- Bellen H.J. (1999) Ten years of enhancer detection: lessons from the fly. *Plant Cell* **11**, 2271-81.
- Beringer J.E. (1974) R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol* **84**, 188-98.
- Bernabéu-Roda L. (2014) Bases moleculares que gobiernan la movilidad *swarming* en *Sinorhizobium meliloti*: conexión con formación de biopelículas y establecimiento de simbiosis. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Bernabéu-Roda L., Calatrava-Morales N., Cuéllar V. & Soto M.J. (2015) Characterization of surface motility in *Sinorhizobium meliloti*: regulation and role in symbiosis. *Symbiosis* **67**, 79-90.
- Bi H., Yu Y., Dong H., Wang H. & Cronan J.E. (2014) *Xanthomonas campestris* RpfB is a fatty Acyl-CoA ligase required to counteract the thioesterase activity of the RpfF diffusible signal factor (DSF) synthase *Mol Microbiol* **93**, 262-75.

- Bitas V., Kim H.S., Bennet J.W. & Kang S. (2013) Sniffing on microbes: Diverse roles of microbial volatile organic compounds in plant health. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 835-43.
- Blair J.M. & Piddock L.J. (2009) Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Curr Opin Microbiol* **12**, 512-9.
- Blatny J.M., Brautaset T., Winther-Larsen H.C., Haugan K. & Valla S. (1997) Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl Environ Microbiol* **63**, 370-9.
- Blom D., Fabbri C., Connor E.C., Schiestl F.P., Klauser D.R., Boller T., Eberl L. & Weiskopf L. (2011) Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ Microbiol* **13**, 3047-58.
- Bobik C., Meilhoc E. & Batut J. (2006) FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**, 4890-902.
- Bonato P., Alves L.R., Osaki J.H., Rigo L.U., Pedrosa F.O., Souza E.M., Zhang N., Schumacher J., Buck M., Wasseem R. & Chubatsu L.S. (2016) The NtrY-NtrX two-component system is involved in controlling nitrate assimilation in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. *FEBS J* **283**, 3919-30.
- Braeken K., Daniels R., Vos K., Fauvart M., Bachaspatimayum D., Vanderleyden J. & Michiels J. (2008) Genetic determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microb Ecol* **55**, 54-64.
- Burch A.Y., Shimada B.K., Mullin S.W., Dunlap C.A., Bowman M.J. & Lindow S.E. (2012) *Pseudomonas syringae* coordinates production of a motility-enabling surfactant with flagellar assembly. *J Bacteriol* **194**, 1287-98.
- Caetano-Anollés G., Wall L.G., De Micheli A.T., Macchi E.M., Bauer W.D. & Favelukes G. (1988) Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* **86**, 1228-35.
- Caetano-Anollés G., Wrobel-Boerner E. & Bauer W.D. (1992) Growth and movement of spot inoculated *Rhizobium meliloti* on the root surface of alfalfa. *Plant Physiol* **98**, 1181-9.
- Capela D., Barloy-Hubler F., Gouzy J., Bothe G., Ampe F., Batut J., Boistard P., Becker A., Boutry M., Cadieu E. (et al). (2001) Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021 *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9877-82.
- Capela D., Carrere S. & Batut J. (2005) Transcriptome-based identification of the *Sinorhizobium meliloti* NodD1 regulon. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4910-3.
- Carrica Mdel C., Fernández I., Martí M.A., Paris G. & Goldbaum F.A. (2012) The NtrY/X two-component system of *Brucella* spp. acts as a redox sensor and regulates the expression of nitrogen respiration enzymes. *Mol (Griffitts & Long 2008) Microbiol* **85**, 39-50.

- Carrica Mdel C., Fernández I., Sieira R., Paris G. & Goldbaum F.A. (2013) The two-component systems PrrBA and NtrYX co-ordinately regulate the adaptation of *Brucella abortus* to an oxygen-limited environment. *Mol Microbiol* **88**, 222-33.
- Casadaban M.M. & Cohen S.N. (1979) Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-*lac* bacteriophage: *In vivo* probe for transcriptional control sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4530-33.
- Casadesús J. & Olivares J. (1979) Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol Gen Genet* **174**, 203-9.
- Caserta R., Picchi S.C., Takita M.A., Tomaz J.P., Pereira W.E., Machado M.A., Ionescu M., Lindow S. & De Souza A.A. (2014) Expression of *Xylella fastidiosa* RpfF in citrus disrupts signaling in *Xanthomonas citri* subsp. *citri* and thereby its virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **27**, 1241-52.
- Casillo A., Papa R., Ricciardelli A., Sannino F., Ziaco M., Tilotta M., Selan L., Marino G., Corsaro M.M., Tutino M.L., Artini M. & Parrilli E. (2017) Anti-biofilm activity of a long-chain fatty aldehyde from antarctic *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Front Cell Infect Microbiol.* **7**.
- Chan Y.Y., Bian H.S., Tan T.M., Mattmann M.E., Geske G.D., Igarashi J., Hatano T., Suga H., Blackwell H.E. & Chua K.L. (2007) Control of quorum sensing by a *Burkholderia pseudomallei* multidrug efflux pump. *J Bacteriol* **189**, 4320-4.
- Chao T.C., Buhmester J., Hansmeier N., Pühler A. & Weidner S. (2005) Role of the regulatory gene *rirA* in the transcriptional response of *Sinorhizobium meliloti* to iron limitation. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5969-82.
- Charoenpanich P., Meyer S., Becker A. & McIntosh M. (2013) Temporal expression program of quorum sensing-based transcription regulation in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **195**, 3224-36.
- Chatnaparat T., Li Z., Korban S.S. & Zhao Y. (2015) The bacterial alarmone (p)ppGpp is required for virulence and controls cell size and survival of *Pseudomonas syringae* on plants. *Environ Microbiol* **17**, 4253-70.
- Cheng H.P. & Walker G.C. (1998) Succinoglycan Is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **180**, 5183-91.
- Cheng Z., Lin M. & Rikihisa Y. (2014) *Ehrlichia chaffeensis* proliferation begins with NtrY/NtrX and PutA/GlnA upregulation and CtrA degradation induced by proline and glutamine uptake. *MBio* **5**, e02141.
- Chevance F.F. & Hughes K.T. (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* **6**, 455-65.
- Chung J.H., Song G.C. & Ryu C.M. (2016) Sweet scents from good bacteria: Case studies on bacterial volatile compounds for plant growth and immunity. *Plant Mol Biol* **90**, 677-87.

- Corral-Lugo A., Daddaoua A., Ortega A., Espinosa-Urgel M. & Krell T. (2016) Rosmarinic acid is a homoserine lactone mimic produced by plants that activates a bacterial quorum-sensing regulator. *Sci Signal* **9**.
- Cosme A.M., Becker A., Santos M.R., Sharypova L.A., Santos P.M. & Moreira L.M. (2008) The outer membrane protein TolC from *Sinorhizobium meliloti* affects protein secretion, polysaccharide biosynthesis, antimicrobial resistance, and symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 947–57.
- Coutinho C.P., de Carvalho C.C., Madeira A., Pinto-de-Oliveira A. & Sa-Correia I. (2011) *Burkholderia cenocepacia* phenotypic clonal variation during a 3.5-year colonization in the lungs of a cystic fibrosis patient. *Infect Immun* **79**, 2950-60.
- Covelli J.M., Althabegoiti M.J., López M.F. & Lodeiro A.R. (2013) Swarming motility in *Bradyrhizobium japonicum*. *Res Microbiol* **164**, 136-44.
- Cuppels D.A. (1986) Generation and characterization of Tn5 insertion mutations in *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Appl Environ Microbiol* **51**, 323-7.
- Cushnie T.P., Cushnie B. & Lamb A.J. (2014) Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents* **44**, 377-86.
- Cuthbertson L. & Nodwell J.R. (2013) The TetR family of regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**, 440-75.
- Danhorn, T. & Fuqua, C. (2007) Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**, 401-22.
- Daniels R., Reynaert S., Hoekstra H., Verreth C., Janssens J., Braeken K., Fauvart M., Beullens S., Heusdens C., Lambrichts I., De Vos D.E., Vanderleyden J., Vermant J. & Michiels J. (2006) Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14965-70.
- Daniels R., Vanderleyden J. & Michiels J. (2004) Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 261-89.
- Deziel E., Lepine F., Milot S. & Villemur R. (2003) *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* **149**, 2005-13.
- Dickschat J.S., Helmke E. & Schulz S. (2005) Volatile organic compounds from arctic bacteria of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group: a retrobiosynthetic approach in chemotaxonomic investigations. *chem Biodivers* **2**, 318-53.
- Dilanji G.E., Teplitski M. & Hagen S.J. (2014) Entropy-driven motility of *Sinorhizobium meliloti* on a semi-solid surface. *Proc Biol Sci* **281**, 20132575.
- Ditta G., Schmidhauser T., Yakobson E., Lu P., Liang X., Finlay D.R., Guiney D. & Helinski D.R. (1985) Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* **13**, 149-53.

- Ditta G., Virts E., Palomares A. & Kim C.H. (1987) The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J Bacteriol* **169**, 3217-23.
- Domínguez-Ferreras A., Pérez-Arnedo R., Becker A., Olivares J., Soto M.J. & Sanjuán J. (2006) Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymb for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**, 7617-25.
- Donlan R.M. (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* **8**, 881–90.
- Drepper T., Wiethaus J., Giaourakis D., Gross S., Schubert B., Vogt M., Wiencek Y., McEwan A.G. & Masepohl B. (2006) Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol Lett* **258**, 250-6.
- Durán P. (2015) Evaluación del efecto ejercido por la metilcetona 2-Tridecanona (2-TDC) en fenotipos de *Sinorhizobium meliloti* GR4 relevantes en el establecimiento de simbiosis mutualista con plantas de alfalfa. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Granada.
- Ebersbach G., Briegel A., Jensen G.J. & Jacobs-Wagner C. (2008) A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *Caulobacter*. *Cell* **134**, 956-68.
- Eda S., Mitsui H. & Minamisawa K. (2011) Involvement of the *smeAB* multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Environ Microbiol* **77**, 2855-62.
- Edwards A., Frederix M., Wisniewski-Dye F., Jones J., Zorreguieta A. & Downie J.A. (2009) The *cin* and *rai* quorum-sensing regulatory systems in *Rhizobium leguminosarum* are coordinated by ExpR and CinS, a small regulatory protein coexpressed with CinI. *J Bacteriol* **191**, 3059-67.
- Effmert U., Kalderas J., Warnke R. & Piechulla B. (2012) Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *J Chem Ecol* **38**, 665-703.
- Egelhoff T.T. & Long S.R. (1985) *Rhizobium meliloti* nodulation genes: identification of *nodDABC* gene products, purification of *nodA* protein, and expression of *nodA* in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **164**, 591-9.
- Elgaali H., Hamilton-Kemp T.R., Newman M.C., Collins R.W., Yu K. & Archbold D.D. (2002) Comparison of long-chain alcohols and other volatile compounds emitted from food-borne and related Gram positive and Gram negative bacteria. *J Basic Microbiol* **42**, 373-80.
- Fenner B.J., Tiwari R.P., Reeve W.G., Dilworth M.J. & Glenn A.R. (2004) *Sinorhizobium medicae* genes whose regulation involves the ActS and/or ActR signal transduction proteins. *FEMS Microbiol Lett* **236**, 21-31.
- Fernández I., Cornaciu I., Del Carmen Carrica M., Uchikawa E., Hoffmann G., Sieira R., Márquez J.A. & Goldbaum F.A. (2017) Three-dimensional structure of full-length NtrX, an unusual member of the NtrC family of response regulators. *J Mol Biol* **429**, 1192-212.

- Fields A.T., Navarrete C.S., Zare A.Z., Huang Z., Mostafavi M., Lewis J.C., Rezaeiaghghi Y., Brezler B.J., Ray S., Rizzacasa A.L., Barnett M.J., Long S.R., Chen E.J. & Chen J.C. (2012) The conserved polarity factor podJ1 impacts multiple cell envelope-associated functions in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* **84**, 892-920.
- Finan T.M., Weidner S., Wong K., Buhrmester J., Chain P., Vorholter F.J., Hernández-Lucas I., Becker A., Cowie A., Gouzy J., Golding B. & Pühler A. (2001) The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti* *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9889-94.
- Fischer H.M. (1994) Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**, 352-86.
- Forney F.W. & Markovetz A.J. (1971) The biology of methyl ketones. *J Lipid Res* **12**.
- Fraser G.M. & Hughes C. (1999) Swarming motility. *Curr Opin Microbiol* **2**, 630-5.
- Fujishige N.A., Kapadia N.N., De Hoff P.L. & Hirsch A.M. (2006a) Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* **56**, 195-206.
- Fujishige N.A., Lum M.R., De Hoff P.L., Whitelegge J.P., Faull K.F. & Hirsch A.M. (2008) *Rhizobium* common *nod* genes are required for biofilm formation. *Mol Microbiol* **67**, 504-15.
- Fujishige N.A., Rinaudi L., Giordano N. & Hirsch A. (2006b) Superficial liaisons: colonization of roots and abiotic surfaces by rhizobia. In: *Biology of plant-microbe interactions* (pp. 292-9).
- Galibert F., Finan T.M., Long S.R., Puhler A., Abola P., Ampe F., Barloy-Hubler F., Barnett M.J., Becker A., Boistard P., Bothe G., Boutry M., Bowser L., Buhrmester J., Cadieu E., Capela D., Chain P., Cowie A., Davis R.W., Dreano S., Federspiel N.A., Fisher R.F., Gloux S., Godrie T., Goffeau A., Golding B., Gouzy J., Gurjal M., Hernandez-Lucas I., Hong A., Huizar L., Hyman R.W., Jones T., Kahn D., Kahn M.L., Kalman S., Keating D.H., Kiss E., Komp C., Lelaure V., Masuy D., Palm C., Peck M.C., Pohl T.M., Portetelle D., Purnelle B., Ramsperger U., Surzycki R., Thebault P., Vandenbol M., Vorholter F.J., Weidner S., Wells D.H., Wong K., Yeh K.C. & Batut J. (2001) The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**, 668-72.
- Galloway W.R., Hodgkinson J.T., Bowden S.D., Welch M. & Spring D.R. (2011) Quorum sensing in Gram-negative bacteria: small-molecule modulation of AHL and AI-2 quorum sensing pathways. *Chem Rev* **111**, 28-67.
- Gao M., Chen H., Eberhard A., Gronquist M.R., Robinson J.B., Rolfe B.G. & Bauer W.D. (2005) *sinI*- and *expR*-dependent quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **187**, 7931-44.
- Gao M., Coggin A., Yagnik K. & Teplitski M. (2012) Role of specific quorum-sensing signals in the regulation of exopolysaccharide II production within *Sinorhizobium meliloti* spreading colonies. *PLoS One* **7**, e42611.
- Garbeva P., Hordijk C., Gerards S. & De Boer W. (2014.) Volatile-mediated interactions between phylogenetically different soil bacteria. *Front Microbiol* **5**, 285-90.

- García-Rodríguez F.M. & Toro N. (2000) *Sinorhizobium meliloti nfe* (Nodulation Formation Efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 583-91.
- Ghelardi E., Salvetti S., Ceragioli M., Gueye S.A., Celandroni F. & Senesi S. (2012) Contribution of surfactin and SwrA to flagellin expression, swimming, and surface motility in *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol* **78**, 6540-4.
- Ghribi L., Nejma A.B., Besbes M., Harzalla-Skhiri F., Flamini G. & Jannet H.B. (2016) Chemical composition, cytotoxic and antibacterial activities of the essential oil from the Tunisian *Ononis angustissima* L. (Fabaceae). *J Oleo Sci* **65**, 339-45.
- Gibson K.E., Barnett M.J., Toman C.J., Long S.R. & Walker G.C. (2007) The symbiosis regulator CbrA modulates a complex regulatory network affecting the flagellar apparatus and cell envelope proteins. *J Bacteriol* **189**, 3591-602.
- Giorgio A., De Stradis A., Lo Cantore P. & Iacobellis N.S. (2015) Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front Microbiol* **6**, 1056.
- Gode-Potratz C.J., Chodur D.M. & McCarter L.L. (2010) Calcium and iron regulate swarming and type III secretion in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Bacteriol* **192**, 6025-38.
- Gourion B., Berrabah F., Ratet P. & Stacey G. (2015) Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci* **20**, 186-94.
- Grangeon R., Zupan J.R., Anderson-Furgeson J. & Zambryski P.C. (2015) PopZ identifies the new pole, and PodJ identifies the old pole during polar growth in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 11666-71.
- Gregor J., Zeller T., Balzer A., Haberzettl K. & Klug G. (2007) Bacterial regulatory networks include direct contact of response regulator proteins: interaction of RegA and NtrX in *Rhodobacter capsulatus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **13**, 126-39.
- Griffitts J.S. & Long S.R. (2008) A symbiotic mutant of *Sinorhizobium meliloti* reveals a novel genetic pathway involving succinoglycan biosynthetic functions. *Mol Microbiol* **67**, 1292-306.
- Groenhagen U., Baumgartner R., Bailly A., Gardiner A., Eberl L., Schulz S. & Weiskopf L. (2013) Production of bioactive volatiles by different *Burkholderia ambifaria* strains. *J Chem Ecol* **39**, 892-906.
- Harshey R.M. & Partridge J.D. (2015) Shelter in a Swarm. *J Mol Biol* **427**, 3683-94.
- Harshey R.M. (2003) Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* **57**, 249-73.
- Hellweg C., Pühler A. & Weidner S. (2009) The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiol* **9**.
- Henrichsen J. (1972) Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* **36**, 478-503.

- Herth W. & Schnepf E. (1980) The fluorochrome, calcofluor white, binds oriented to structural polysaccharide fibrils. *Protoplasma* **105**, 129-33.
- Hirsch A., Lum N. & Fujishige N. (2009) Microbial encounters of a symbiotic kind: Attaching to roots and other surfaces. In: *Plant cell monographs* (Springer Berlin / Heidelberg).
- Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K. & Pease L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**, 51-9.
- Hoang H.H., Becker A. & Gonzalez J.E. (2004) The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J Bacteriol* **186**, 5460-72.
- Holloway P., McCormick W., Watson R.J. & Chan Y. (1996) Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **178**, 1505-14.
- Hornig Y.T., Deng S.C., Daykin M., Soo P.C., Wei J.R., Luh K.T., Ho S.W., Swift S., Lai H.C. & Williams P. (2002) The LuxR family protein SpnR functions as a negative regulator of N-acylhomoserine lactone-dependent quorum sensing in *Serratia marcescens*. *Mol Microbiol* **45**, 1655-71.
- Huber B., Riedel K., Hentzer M., Heydorn A., Gotschlich A., Givskov M., Molin S. & Eberl L. (2001) The *cep* quorum sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility. *Microbiology* **147**, 2517-28.
- Hübner P., Willison J.C., Vignais P.M. & Bickle T.A. (1991) Expression of regulatory *nif* genes in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* **173**, 2993-9.
- Innocent E., Gikonyo N.K. & Nkunya M.H. (2008) Repellency property of long chain aliphatic methyl ketones against *Anopheles gambiae* s.s. *Tanzan J Health Res* **10**, 50-4.
- Inoue T., Shingaki R., Hirose S., Waki K., Mori H. & Fukui K. (2007) Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **189**, 950-7.
- Insam H. & Seewald M.S.A. (2010) Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and Fertility of Soils* **46**, 199-213.
- Ishida M.L., Assumpção M.C., Machado H.B., Benelli E.M., Souza E.M. & Pedrosa F.O. (2002) Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. *Braz J Med Biol Res* **35**, 651-61.
- Jain D.K., Collins-Thompson D.L., Lee H. & Trevors J.T. (1991) A drop-collapse test for screening surfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Methods* **13**, 271-79.
- Janczarek M. (2011) Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int J Mol Sci* **12**, 7898-933.
- Jones K.M., Kobayashi H., Davies B.W., Taga M.E. & Walker G.C. (2007) How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* **5**, 619-33.

- Kai M., Hausteil M., Molina F., Petri A., Scholz B. & Piechulla B. (2009) Bacterial volatiles and their action potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **81**, 1001-12.
- Kakkar A., Nizampatnam N.R., Kondreddy A., Pradhan B.B. & Chatterjee S. (2015) *Xanthomonas campestris* cell-cell signalling molecule DSF (diffusible signal factor) elicits innate immunity in plants and is suppressed by the exopolysaccharide xanthan. *J Exp Biol* **66**, 6697–714.
- Kawagishi I., Imagawa M., Imae Y., McCarter L. & Homma M. (1996) The sodium-driven polar flagellar motor of marine *Vibrio* as the mechanosensor that regulates lateral flagellar expression. *Mol Microbiol* **20**, 693–9.
- Kearns D.B. & Losick R. (2003) Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**, 581–90.
- Kearns D.B. (2010) A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**, 634-44.
- Kim K.S., Lee S. & Ryu C.M. (2013) Interspecific bacterial sensing through airborne signals modulates locomotion and drug resistance. *Nat Commun* **4**, 1809.
- Kimps N.W., Bissinger B.W., Apperson C.S., Sonenshine D.E. & Roe R.M. (2011) First report of the repellency of 2-tridecanone against ticks. *Med Vet Entomol* **25**, 202-8.
- Kirillov V., Stikhareva T., Suleimen Y., Serafimovich M., Kabanova S. & Mukanov B. (2017) Chemical composition of the essential oil from carnation coniferous (*Dianthus acicularis* Fisch. ex Ledeb) growing wild in Northern Kazakhstan. *Nat Prod Res* **31**, 117-23.
- Kotowska U. & Isidorov V.A. (2011) Partition coefficients of ketones, phenols, aliphatic and aromatic acids, and esters in n-hexane/nitromethane. *Cent Eur J Chem* **9**, 813-24.
- Krol E. & Becker A. (2004) Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol Genet Genomics* **272**, 1-17.
- Krol E. & Becker A. (2011) ppGpp in *Sinorhizobium meliloti*: biosynthesis in response to sudden nutritional downshifts and modulation of the transcriptome. *Mol Microbiol* **81**, 1233-54.
- Krol E. & Becker A. (2014) Rhizobial homologs of the fatty acid transporter FadL facilitate perception of long-chain acyl-homoserine lactone signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 10702-7.
- Laloux G. & Jacobs-Wagner C. (2014) How do bacteria localize proteins to the cell pole? *J Cell Sci* **127**, 11-9.
- Lehmann M., Tshisuada B., Fetzner S. & Lingens F. (1995) Molecular cloning of the isoquinoline 1-oxidoreductase genes from *Pseudomonas diminuta* 7. Structural analysis of IorA and IorB, and sequence comparisons with other molybdenum-containing hydroxylases. *J Biol Chem* **270**, 14420-29.
- Lemfack M.C., Nickel J., Dunkel M., Preissner R. & Piechulla B. (2014) mVOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research* **42**, D744-D8.

- Letoffe S., Audrain B., Bernier S.P. & *etal.* (2014) Aerial exposure to the bacterial volatile compound trimethylamine modifies antibiotic resistance of physically separated bacteria by raising culture medium pH. *MBio* **5**, e00944-13.
- Lindstrom K., Murwira M., Willems A. & Altier N. (2010) The biodiversity of beneficial microbe-host mutualism: the case of rhizobia. *Res Microbiol* **161**, 53-463.
- Liu Z., Jacobs M., Schaff D.A., McCullen C.A. & Binns A.N. (2001) ChvD, a chromosomally encoded ATP-binding cassette transporter-homologous protein involved in regulation of virulence gene expression in *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **183**, 3310-7.
- Marketon M.M., Gronquist M.R., Eberhard A. & González J.E. (2002) Characterization of the *Sinorhizobium meliloti sinR/sinI* locus and the production of novel N-Acyl homoserine lactones. *J Bacteriol* **184**, 5686-95.
- Martínez J.L., Sánchez M.B., Martínez-Solano L., Hernández A., Garmendia L., Fajardo A. & Álvarez-Ortega C. (2009) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol Rev* **33**, 430-49.
- Martínez-Abarca F., Martínez-Rodríguez L., López-Contreras J.A., Jiménez-Zurdo J.I. & Toro N. (2013) Complete genome sequence of the alfalfa symbiont *Sinorhizobium/Ensifer meliloti* strain GR4. *Genome Announc* **1**, 1-2.
- Matilla M.A., Ramos J.L., Duque E., de Dios Alche J., Espinosa-Urgel M. & Ramos-González M.I. (2007) Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol* **9**, 1842-50.
- McDougald D., Rice S.A., Barraud N., Steinberg P.D. & Kjelleberg S. (2012) Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat Rev Microbiol* **10**, 39-50.
- McIntosh M., Krol E. & Becker A. (2008) Competitive and cooperative effects in quorum-sensing-regulated galactoglucan biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **190**, 5308-17.
- Meade H.M. & Signer E.R. (1977) Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 2076-8.
- Meier V.M., Muschler P. & Scharf B.E. (2007) Functional analysis of nine putative chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **189**, 1816-26.
- Mellor H.Y., Glenn A.R., Arwas R. & Dilworth M.J. (1987) Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifolii* TA1. *Arch Microbiol* **148**, 34-9.
- Miguel E., Poza-Carrión C., López-Solanilla E., Aguilar I., Llama-Palacios A, García-Olmedo F. & Rodríguez-Palenzuela P. (2000) Evidence against a direct antimicrobial role of H₂O₂ in the infection of plants by *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 421-9.
- Miller J.H. (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory.

- Miller L.D., Yost C.K., Hynes M.F. & Alexandre G. (2007) The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is essential for competitive nodulation. *Mol Microbiol* **63**, 348-62.
- Miller-Williams M., Loewen P.C. & Oresnik I.J. (2006) Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021. *Microbiology* **152**, 2049-59.
- Mireles J.R., Toguchi A. & Harshey R.M. (2001) *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation *J Bacteriol* **183**, 5848-54.
- Molina-Santiago C., Daddaoua A., Fillet S., Duque E. & Ramos J.L. (2014) Interspecies signalling: *Pseudomonas putida* efflux pump TtgGHI is activated by indole to increase antibiotic resistance. *Environ Microbiol* **16**, 1267-81.
- Morimoto Y.V. & Minamino T. (2014) Structure and function of the bi-directional bacterial flagellar motor. *Biomolecules* **4**, 217-34.
- Morris J. & González J.E. (2009) The novel genes *emmABC* are associated with exopolysaccharide production, motility, stress adaptation, and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **191**, 5890-900.
- Mulligan J.T. & Long S.R. (1985) Induction of *Rhizobium meliloti* *nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 6609-13.
- Ng W.L. & Bassler B.L. (2009) Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annu Rev Genet* **43**, 197-222.
- Nogales J., Bernabéu-Roda L., Cuéllar V. & Soto M.J. (2012) ExpR is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **194**, 2027-35.
- Nogales J., Campos R., BenAbdelkhalek H., Olivares J., Lluch C. & Sanjuán J. (2002) *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 225-32.
- Nogales J., Domínguez-Ferreras A., Amaya-Gómez C.V., van Dillewijn P., Cuéllar V., Sanjuán J., Olivares J. & Soto M.J. (2010) Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti* *fadD* mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics* **11**, 157.
- Noonan B., Motherway M. & O'Gara F. (1992) Ammonia regulation of the *Rhizobium meliloti* nitrogenase structural and regulatory genes under free-living conditions: involvement of the *fixL* gene product? *Mol Gen Genet* **234**, 423-8.
- Oldroyd G.E. (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* **11**, 252-63.
- Oldroyd G.E., Murray J.D., Poole P.S. & Downie J.A. (2011) The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu Rev Genet* **45**, 119-44.

- Olivares J., Casadesús J. & Bedmar E.J. (1980) Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Appl Environ Microbiol* **39**, 967-70.
- Orozco-Mosqueda Mdel C., Macías-Rodríguez L.I., Santoyo G., Farias-Rodríguez R. & Valencia-Cantero E. (2013) *Medicago truncatula* increases its iron-uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiol (Praha)* **58**, 579-85.
- Overhage J., Bains M., Brazas M.D. & Hancock R.E. (2008) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**, 2671–9.
- Pamp S. & Tolker-Nielsen T. (2007) Multiple roles of biosurfactants in structural biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**, 2531-9.
- Papenfort K. & Bassler B.L. (2016) Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* **14**, 576-88.
- Partridge J.D. & Harshey R.M. (2013a) Swarming: flexible roaming plans. *J Bacteriol* **195**, 909-18.
- Partridge J.D. & Harshey R.M. (2013b) More than motility: *Salmonella* flagella contribute to overriding friction and facilitating colony hydration during swarming. *J Bacteriol* **195**, 919-29.
- Patel R.N., Hou C.T., Laskin A.I., Felix A. & Derelanko P. (1980) Microbial oxidation of gaseous hydrocarbons: production of methylketones from corresponding n-alkanes by methane-utilizing bacteria. *Appl Environ Microbiol* **39**, 727–33.
- Patrick J.E. & Kearns D.B. (2012) Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis. *Mol Microbiol* **83**, 14-23.
- Pawlowski K., Klosse U. & de Bruijn F.J. (1991) Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. *Mol Gen Genet* **231**, 124-38.
- Pearson J.P., van Delden C. & Iglewski B.H. (1999) Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**, 1203-10.
- Pech-Canul A., Nogales J., Miranda-Molina A., Álvarez L., Geiger O., Soto M.J. & López-Lara I.M. (2011) FadD is required for utilization of endogenous fatty acids released from membrane lipids. *J Bacteriol* **193**, 6295-304.
- Peláez-Vico M.A., Bernabéu-Roda L., Kohlen W., Soto M.J. & López-Ráez J.A. (2016) Strigolactones in the *Rhizobium*-legume symbiosis: Stimulatory effect on bacterial surface motility and down-regulation of their levels in nodulated plants. *Plant Sci* **245**, 119-27.
- Pellock B.J., Teplitski M., Boinay R.P., Bauer W.D. & Walker G.C. (2002) A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **184**, 5067-76.

- Peñuelas J., Asensio D., Tholl D., Wenke K., Rosenkranz M., Piechulla B. & Schnitzler J.P. (2014) Biogenic volatile emissions from the soil. *Plant Cell Environ* **37**, 1866-91.
- Pérez-Montaño F., Jiménez-Guerrero I., Del Cerro P., Baena-Ropero I., López-Baena F.J., Ollero F.J., Bellogín R., Lloret J. & Espuny R. (2014) The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, is regulated by Quorum Sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. *PLoS One* **9**, e105901.
- Perret X., Staehelin C. & Broughton W.J. (2000) Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 180-201.
- Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45.
- Raza W., Wang J., Wu Y., Ling N., Wei Z., Huang Q. & Shen Q. (2016) Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**, 7639-50.
- Rigaud J. & Puppo A. (1975) Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J Gen Microbiol* **88**, 223-8.
- Rinaudi L.V. & Giordano W. (2010) An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol Lett* **304**, 1-11.
- Robertsen B.K., Aman P., Darvill A.G., McNeil M. & Albersheim P. (1981) Host-Symbiont Interactions: The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol* **67**, 389-400.
- Robledo M., Jiménez-Zurdo J.I., Velázquez E., Trujillo M.E., Zurdo-Pineiro J.L., Ramírez-Bahena M.H., Ramos B., Díaz-Mínguez J.M., Dazzo F., Martínez-Molina E. & Mateos P.F. (2008) *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7064-9.
- Robledo M., Rivera L., Jiménez-Zurdo J.I., Rivas R., Dazzo F., Velázquez E., Martínez-Molina E., Hirsch A.M. & Mateos P.F. (2012) Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microb Cell Fact* **11**, 1-12.
- Rodríguez R.L. & Tait R.C. (1983) Recombinant DNA techniques: an introduction. Addison-Wesley, Reading, Massachusetts.
- Rodríguez-Navarro D.N., Rodríguez-Carvajal M.A., Acosta-Jurado S., Soto M.J., Margaret I., Crespo-Rivas J.C., Sanjuán J., Temprano F., Gil-Serrano A., Ruíz-Sáinz J.E. & Vinardell J.M. (2014) Structure and biological roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 exopolysaccharide. *PLoS One* **9**, e115391.
- Rosenberg M., Gutnick D. & Rosenberg E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Lett.* **9**, 29-33.

- Rosbach S., Kunze K., Albert S., Zehner S. & Gottfert M. (2014) The *Sinorhizobium meliloti* EmrAB efflux system is regulated by flavonoids through a TetR-like regulator (EmrR). *Mol Plant Microbe Interact* **27**, 379-87.
- Rotter C., Mühlbacher S., Salamon D., Schmitt R. & Scharf B. (2006) Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **188**, 6932-42.
- Rüberg S., Tian Z.-X., Krol E., Linke B., Meyer F., Wang Y., Pühler A., Weidner S. & Becker A. (2003) Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J Bacteriol* **106**, 255-68.
- Russo D.M., Williams A., Edwards A., Posadas D.M., Finnie C., Dankert M., Downie J.A. & Zorreguieta A. (2006) Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* **188**, 4474-86.
- Ruyter-Spira C., Al-Babili S., van der Krol S. & Bouwmeester H. (2013) The biology of strigolactones. *Trends Plant Sci* **18**, 72-83.
- Ryan R.P., An S.Q., Allan J.H., McCarthy Y. & Dow J.M. (2015) The DSF family of cell-cell signals: an expanding class of bacterial virulence regulators. *PLoS Pathog* **11**, e1004986.
- Ryu C.M., Farag M.A., Hu C.H., Reddy M.S., Kloepper J.W. & Pare P.W. (2004) Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **134**, 1017-26.
- Sambrook J., Fritsch E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanselicio S., Berge M., Theraulaz L., Radhakrishnan S.K. & Viollier P.H. (2015) Topological control of the *Caulobacter* cell cycle circuitry by a polarized single-domain PAS protein. *Nat Commun* **6**, 7005.
- Santos M.R., Cosme A.M., Becker J.D., Medeiros J.M., Mata M.F. & Moreira L.M. (2010) Absence of functional TolC protein causes increased stress response gene expression in *Sinorhizobium meliloti*. *BMC Microbiol* **10**.
- Santos M.R., Marques A.T., Becker J.D. & Moreira L.M. (2014) The *Sinorhizobium meliloti* EmrR regulator is required for efficient colonization of *Medicago sativa* root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* **27**, 388-99.
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G. & Pühler A. (1994) Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**, 69-73.
- Schäper S., Krol E., Skotnicka D., Kaefer V., Hilker R., Sogaard-Andersen L. & Becker A. (2015) Cyclic di-GMP regulates multiple cellular functions in the symbiotic alphaproteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **198**, 521-35.

- Scharf B., Schuster-Wolff-Buhring H., Rachel R. & Schmitt R. (2001) Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation *J Bacteriol* **183**, 5334-42.
- Schirmer T. & Jenal U. (2009) Structural and mechanistic determinants of c-di-GMP signalling. *Nat Rev Microbiol* **7**, 724-35.
- Schlüter J.P., Czuppon P., Schauer O., Pfaffelhuber P., McIntosh M. & Becker A. (2015) Classification of phenotypic subpopulations in isogenic bacterial cultures by triple promoter probing at single cell level. *J Biotechnol* **198**, 3-14.
- Schlüter J.P., Reinkensmeier J., Barnett M.J., Lang C., Krol E., Giegerich R., Long S.R. & Becker A. (2013) Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. *BMC Genomics* **14**, 156.
- Schmidt R., Cordovez V., de Boer W., Raaijmakers J. & Garbeva P. (2015) Volatile affairs in microbial interactions. *ISME J* **9**, 2329-35.
- Schorkopf D.L., Hrnčir M., Mateus S., Zucchi R., Schmidt V.M. & Barth F.G. (2009) Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. *J Exp Biol* **212**, 1153-62.
- Schulz-Bohm K., Zweers H., de Boer W. & Garbeva P. (2015) A fragrant neighborhood: volatile mediated bacterial interactions in soil. *Front Microbiol* **6**, 1212.
- Semenov S.N., Koziel J.A. & Pawliszyn J. (2000) Kinetics of solid-phase extraction and solid-phase microextraction in thin adsorbent layer with saturation sorption isotherm. *J. Chromatogr. A* **873**, 39-51.
- Shaw P.D., Ping G., Daly S.L., Cha C., Cronan J.E., Rinehart K.L. & Farrand S.K. (1997) Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 6036-41.
- Shrout J.D., Chopp D.L., Just C.L., Hentzer M., Givskov M. & Parsek M.R. (2006) The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional *Mol Microbiol* **62**, 1264-77.
- Smith T.G. & Hoover T.R. (2009) Chapter 8 Deciphering bacterial flagellar gene regulatory networks in the genomic era. In: *Advances in Applied Microbiology, 1st Edition* (eds. by Laskin A, Gadd G & Sariaslani S), pp. 257-95. Elsevier Inc.
- Soby S. & Bergman K. (1983) Motility and chemotaxis of *Rhizobium meliloti* in soil. *Appl Environ Microbiol* **46**, 995-8.
- Soini H.A., Schrock S.E., Bruce K.E., Wiesler D., Ketterson E.D. & Novotny M.V. (2007) Seasonal variation in volatile compound profiles of preen gland secretions of the dark-eyed junco (*Junco hyemalis*). *J Chem Ecol* **33**, 183-98.

- Soto M.J., Calatrava-Morales N. & López-Lara I.M. (2017) Functional roles of non-membrane lipids in bacterial signaling. In: *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (ed. by Geiger O), pp. 1-17. Springer.
- Soto M.J., Domínguez-Ferreras A., Pérez-Mendoza D., Sanjuán J. & Olivares J. (2009) Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol* **11**, 381-8.
- Soto M.J., Fernández-Pascual M., Sanjuán J. & Olivares J. (2002) A *fadD* mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. *Mol Microbiol* **43**, 371-82.
- Soto M.J., Sanjuán J. & Olivares J. (2006) Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* **152**, 3167-74.
- Sourjik V., Muschler P., Scharf B. & Schmitt R. (2000) VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **182**, 782-88.
- Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, 503-17.
- Spaink H.P., Okker R.J., Wijffelman C.A., Pees E. & Lugtenberg B.J. (1987) Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* **9**, 27-39.
- Takahashi C., Nozawa T., Tanikawa T., Nakagawa Y., Wakita J., Matsushita M. & Matsuyama T. (2008) Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 without differentiation into elongated hyperflagellates on hard agar minimal medium. *FEMS Microbiol Lett* **280**, 169-75.
- Tambalo D.D., Vanderlinde E.M., Robinson S., Halmillawewa A., Hynes M.F. & Yost C.K. (2014) Legume seed exudates and *Physcomitrella patens* extracts influence swarming behavior in *Rhizobium leguminosarum*. *Can J Microbiol* **60**, 15-24.
- Tambalo D.D., Yost C.K. & Hynes M.F. (2010) Characterization of swarming motility in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *FEMS Microbiol Lett* **307**, 165-74.
- Teplitski M., Robinson J.B. & 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. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 637-48.
- Tiaden A. & Hilbi H. (2012) alpha-Hydroxyketone synthesis and sensing by *Legionella* and *Vibrio*. *Sensors (Basel)* **12**, 2899-919.
- Tiaden A., Spirig T. & Hilbi H. (2010) Bacterial gene regulation by alpha-hydroxyketone signaling. *Trends Microbiol* **18**, 288-97.
- Torres M.J., Hidalgo-García A., Bédmar E.J. & Delgado M.J. (2013) Functional analysis of the copy 1 of the *fixNOQP* operon of *Ensifer meliloti* under free-living micro-oxic and symbiotic conditions. *J Appl Microbiol* **114**, 1772-81.

- Torres M.J., Rubia M.I., de la Pena T.C., Pueyo J.J., Bédmar E.J. & Delgado M.J. (2014) Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti*. *BMC Microbiol* **14**, 142.
- Toutain C.M., Zegans M.E. & O'Toole G.A. (2005) Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **187**, 771–7.
- Tremblay J. & Deziel E. (2010) Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility. *BMC Genomics* **11**, 587.
- Turner L., Zhang R., Darnton N.C. & Berg H.C. (2010) Visualization of flagella during bacterial swarming. *J Bacteriol* **192**, 3259-67.
- Tyc O., Song C., Dickschat J.S., Vos M. & Garbeva P. (2017) The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria. *Trends Microbiol* **25**, 280-92.
- van Dillewijn P., Sanjuán J., Olivares J. & Soto M.J. (2009) The *tep1* gene of *Sinorhizobium meliloti* coding for a putative transmembrane efflux protein and N-acetyl glucosamine affect nod gene expression and nodulation of alfalfa plants. *BMC Microbiol* **9**, 17.
- Verstraeten N., Braeken K., Debkumari B., Fauvart M., Fransaeer J., Vermant J. & Michiels J. (2008) Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol* **16**, 496-506.
- Wang C., Kemp J., Da Fonseca I.O., Equi R.C., Sheng X., Charles T.C. & Sobral B.W. (2010) *Sinorhizobium meliloti* 1021 loss-of-function deletion mutation in *chv1* and its phenotypic characteristics. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 153-60.
- Wang D., Xue H., Wang Y., Yin R., Xie F. & Luo L. (2013) The *Sinorhizobium meliloti ntrX* gene is involved in succinoglycan production, motility, and symbiotic nodulation on alfalfa. *Appl Environ Microbiol* **79**, 7150-9.
- Wang P., Zhong Z., Zhou J., Cai T. & Zhu J. (2008) Exopolysaccharide biosynthesis is important for *Mesorhizobium tianshanense*: plant host interaction. *Arch Microbiol* **189**, 525-30.
- Wang Q., Frye J.G., McClelland M. & 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**, 169-87.
- Wang X.Y., Zhou L., Yang J., Ji G.H. & He Y.W. (2016) The RpfB-dependent Quorum Sensing signal turnover system is required for adaptation and virulence in rice bacterial blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* **29**, 220-30.
- Waters C.M. (2013) Bacterial wheel locks: extracellular polysaccharide inhibits flagellar rotation. *J Bacteriol* **195**, 409-10.
- Weise T., Kai M., Gummesson A., Troeger A., von Reuß S., Piepenborn S., Kosterka F., Sklorz M., Zimmermann R. & Francke W. (2012) Volatile organic compounds produced by the phytopathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 85-10. *Beilstein J Org Chem* **8**, 579-96.

- Weise T., Thürmer A., Brady S., Kai M., Daniel R., Gottschalk G. & Piechulla B. (2014) VOC emission of various *Serratia* species and isolates and genome analysis of *Serratia plymuthica* 4Rx13. *FEMS Microbiol Lett* **352**, 45-53.
- Wells D.H. & Long S.R. (2002) The *Sinorhizobium meliloti* stringent response affects multiple aspects of symbiosis. *Mol Microbiol* **43**, 1115–27.
- Williams W.G., Kennedy G.G., Yamamoto R.T., Thacker J.D. & Bordner J. (1980) 2-Tridecanone: a naturally occurring insecticide from the wild tomato *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. *Science* **207**, 888-9.
- Winson M.K., Swift S., Hill P.J., Sims C.M., Griesmayr G., Bycroft B.W., Williams P. & Stewart G.S.A.B. (1998) Engineering the *luxCDABE* genes from *Photobacterium luminescens* to provide a bioluminescent reporter for constitutive and promoter probe plasmids and mini-Tn5 constructs. *FEMS Microbiol Lett* **163**, 193-202.
- Wood W.F., Shaffer T.B. & Kubo A. (1995) Volatile ketones from interdigital glands of black-tailed deer, *Odocoileus hemionus columbianus*. *J Chem Ecol* **21**, 1401-8.
- Xu G.M. (2016) Relationships between the Regulatory Systems of Quorum Sensing and Multidrug Resistance. *Front Microbiol* **7**, 958.
- Yanisch-Perron C., Vieira J. & Messing J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-19.
- Yost C.K., Del Bel K.L., Quandt J. & Hynes M.F. (2004) *Rhizobium leguminosarum* methyl-accepting chemotaxis protein genes are down-regulated in the pea nodule. *Arch Microbiol* **182**, 505-13.
- Yost C.K., Rochepeau P. & Hynes M.F. (1998) *Rhizobium leguminosarum* contains a group of genes that appear to code for methyl-accepting chemotaxis proteins. *Microbiology* **144**, 1945-56.
- Yu A.Q., Pratomo Juwono N.K., Leong S.S. & Chang M.W. (2014) Production of Fatty Acid-derived valuable chemicals in synthetic microbes. *Front Bioeng Biotechnol* **2**, 78.
- Yu K., Hamilton-Kemp T.R., Archbold D.D., Collins R.W. & Newman M.C. (2000) Volatile compounds from *Escherichia coli* O157:H7 and their absorption by strawberry fruit. *J Agric Food Chem* **48**, 413-7.
- Zhan H., Lee C.C. & Leigh J.A. (1991) Induction of the second exopolysacchride (EPSb) in *Rhizobium meliloti* SU47 by low phosphate concentrations. *J Bacteriol* **173**, 7391-4.
- Zhang Y., Ruyter-Spira C. & Bouwmeester H.J. (2015) Engineering the plant rhizosphere. *Curr Opin Biotechnol* **32**, 136-42.
- Zhang Z. & Pawliszyn J. (1993) Headspace solid-phase microextraction. *Anal Chem* **65**, 1843–52.
- Zhao S., Fung-Leung W., Bittner A., Ngo K. & Liu X. (2014) Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T Cells. *PLoS One* **9**, 1-13.

- Zheng H., Mao Y., Teng J., Zhu Q., Ling J. & Zhong Z. (2015) Flagellar-dependent motility in *Mesorhizobium tianshanense* is involved in the early stage of plant host interaction: study of an *flgE* mutant. *Curr Microbiol* **70**, 219-27.
- Zhou L., Yu Y., Chen X., Diab A.A., Ruan L., He J., Wang H. & He Y.W. (2015) The multiple DSF-family QS signals are synthesized from carbohydrate and branched-chain amino acids via the FAS elongation cycle. *Sci Rep* **5**, 13294.
- Zhou L., Zhang L.H., Cámara M. & He Y.W. (2017) The DSF family of quorum sensing signals: diversity, biosynthesis, and turnover. *Trends Microbiol* **25**, 293-303.
- Zipfel C. & Oldroyd G.E. (2017) Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* **543**, 328-36.

The NtrY/NtrX System of *Sinorhizobium meliloti* GR4 Regulates Motility, EPS I Production, and Nitrogen Metabolism but is Dispensable for Symbiotic Nitrogen Fixation

Nieves Calatrava-Morales, Joaquina Nogales, Kinia Amezttoy, Bart van Steenbergen, and María J. Soto

Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

Accepted 8 April 2017.

Sinorhizobium meliloti can translocate over surfaces. However, little is known about the regulatory mechanisms that control this trait and its relevance for establishing symbiosis with alfalfa plants. To gain insights into this field, we isolated Tn5 mutants of *S. meliloti* GR4 with impaired surface motility. In mutant strain GRS577, the transposon interrupted the *ntrY* gene encoding the sensor kinase of the NtrY/NtrX two-component regulatory system. GRS577 is impaired in flagella synthesis and overproduces succinoglycan, which is responsible for increased biofilm formation. The mutant also shows altered cell morphology and higher susceptibility to salt stress. GRS577 induces nitrogen-fixing nodules in alfalfa but exhibits decreased competitive nodulation. Complementation experiments indicate that both *ntrY* and *ntrX* account for all the phenotypes displayed by the *ntrY::Tn5* mutant. Ectopic overexpression of VisNR, the motility master regulator, was sufficient to rescue motility and competitive nodulation of the transposant. A transcriptome profiling of GRS577 confirmed differential expression of *exo* and flagellar genes, and led to the demonstration that NtrY/NtrX allows for optimal expression of denitrification and *nifA* genes under microoxic conditions in response to nitrogen compounds. This study extends our knowledge of the complex role played by NtrY/NtrX in *S. meliloti*.

Motility is a feature of great importance in bacterial ecology. The ability to move provides bacteria with an increased efficiency to acquire nutrients and avoid toxic substances, as well as the capacity to approach and colonize potential hosts. However, the costs of motility are significant due to the metabolic burden of synthesizing flagellar components and the energetic expense of fueling flagellar motors, but also as an alerting signal of the host immune system. Therefore, it is not surprising that both the synthesis and function of flagella are subject to strict control.

Rhizobia are motile bacteria that can exist either as free-living organisms in the soil or in symbiotic association with their host legume plants, in which they induce the formation of nitrogen-

fixing root nodules. The establishment of efficient symbiosis is a complex process that requires continuous and precise signaling between the two partners (Downie 2010; Oldroyd et al. 2011). It is generally accepted that motility is not essential for nodulation or nitrogen fixation, although it is thought to be important in the initial stages of the symbiosis by directing bacteria to the proper infection sites. In agreement with this, different studies performed with nonflagellated, nonmotile, or nonchemotactic rhizobial strains showed that these bacteria were less competitive and less efficient in nodulation (Ames and Bergman 1981; Bernabéu-Roda et al. 2015; Caetano-Anollés et al. 1988, 1992; Mellor et al. 1987; Miller et al. 2007).

In the alfalfa endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*, the genes required for flagellar motility (i.e., the flagellar regulon) are expressed in a transcriptional hierarchy. The master regulatory genes *visN* and *visR* of class IA and the regulatory *rem* gene belonging to class IB are at the top of the transcriptional cascade (Rotter et al. 2006; Sourjik et al. 2000). Expression of these class I genes is influenced by different regulators, including two-component regulatory systems (TCS), which participate in the coordinated control of motility and exopolysaccharide (EPS) synthesis in response to specific environmental conditions (Morris and González 2009; Yao et al. 2004).

In addition to the well-known swimming motility (flagella-dependent movement of bacteria within liquid environments), *S. meliloti* can translocate over semisolid surfaces by employing different mechanisms, depending on the strain. Strains carrying a functional *expR* gene exhibit an unusual quorum sensing-controlled spreading (or surfing) which is mostly driven by physical or chemical effects created by the secreted EPS galactoglucan (EPS II) (Dilanji et al. 2014; Gao et al. 2012). ExpR-deficient strains such as the reference laboratory strain Rm1021 can also translocate over surfaces using at least two different types of motility. One type is flagellum-independent surface spreading or sliding, which is dependent on the siderophore rhizobactin 1021 (Nogales et al. 2010, 2012). The second type of surface translocation shown by *S. meliloti* Rm1021 is swarming, absolutely dependent on flagellar action and positively influenced by EPS (Nogales et al. 2012). Unlike Rm1021, *S. meliloti* strain GR4, which is an ExpR-deficient strain unable to produce the siderophore rhizobactin 1021, can translocate over semisolid surfaces by using a mechanism which is absolutely dependent on flagellar action (i.e., it only shows swarming motility) (Bernabéu-Roda et al. 2015). Swarming is a surface-associated multicellular behavior extensively studied in pathogenic bacteria due to its close connection with the

Corresponding author: M. J. Soto; Telephone: +34-958181600. Ext. 150; Fax: +34-958181609; E-mail: mariajose.soto@eez.csic.es

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that four supplementary figures and three supplementary tables are published online.

virulence of these microorganisms (Verstraeten et al. 2008). In contrast, in *S. meliloti*, the genetic determinants controlling surface motility in general and swarming in particular as well as the role of this specialized type of translocation in the establishment of symbiosis are mostly unknown.

With the aim of identifying new molecular mechanisms governing swarming in *S. meliloti*, we isolated GR4-derived transposants with impaired surface motility. Here, we report on the characterization of one of these mutants (GRS577) in which the transposon interrupted the *ntrY* gene which codes for the histidine kinase of the NtrY/NtrX TCS. In other species, this system is mainly involved in the regulation of nitrogen metabolism. In *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum brasilense*, *Rhizobium tropici*, *Rhodobacter capsulatus*, *Ehrlichia chaffeensis*, and *Herbaspirillum seropedicae*, the TCS is required to assimilate different nitrogen sources (Bonato et al. 2016; Cheng et al. 2014; Drepper et al. 2006; Ishida et al. 2002; Nogales et al. 2002; Pawlowski et al. 1991). In *Azorhizobium caulinodans* and *R. capsulatus*, the system is required for nitrogen fixation. In *Brucella* spp., NtrY/NtrX acts as a redox sensor that influences bacterial replication within eukaryotic cells (Carrica et al. 2012). In *Brucella* spp. as well as in *Neisseria gonorrhoeae*, the TCS regulates the expression of respiratory enzymes, including nitrogen respiration (denitrification) enzymes, and high-affinity cytochrome oxidases (Atack et al. 2013; Carrica et al. 2012, 2013). In addition to nitrogen metabolism, in the photosynthetic bacterium *R. capsulatus*, the NtrY/NtrX system also regulates the formation of photosynthetic complexes (Gregor et al. 2007). Interestingly, in *S. meliloti* strain Rm1021, the response regulator NtrX but not the histidine kinase NtrY was suggested to be involved in the regulation of succinoglycan (EPS I) production, motility, and symbiotic nitrogen fixation (Wang et al. 2013).

Results obtained during characterization of the *ntrY*:Tn5 mutant GRS577 described in this work support the notion that *ntrY* and *ntrX* are genetically coupled in *S. meliloti*, and unveil a complex regulatory role for this TCS. Both genes participate in the control of flagella and EPS production, contribute to maintain cell membrane integrity, and are required for salt stress tolerance. In addition, under microaerobic conditions, the NtrY/NtrX system regulates nitrogen fixation and respiration genes. Importantly, our data indicate that the NtrY/NtrX system influences root colonization and competition for nodule occupancy on alfalfa plants but is not essential for symbiotic nitrogen fixation.

RESULTS

Identification and characterization of GRS577, an *S. meliloti* GR4 *ntrY*:Tn5 mutant.

To identify *S. meliloti* genes playing a role in swarming motility, strain GR4 was subject to Tn5 transposon mutagenesis. In total, 5,800 kanamycin-resistant transposants were tested for surface motility on semisolid minimal medium (MM). Fourteen mutants were identified that exhibited reduced surface motility relative to the wild-type (WT) strain (GR4 reduced swarming [GRS]) (Fig. 1A). Genetic characterization of these mutants revealed several genes potentially playing a role in the control of GR4 surface motility. Among them were genes involved in the turnover of second messengers, as well as uncharacterized genes coding for putative proteins involved in transport, central intermediary metabolism, or transcriptional regulation, or of unknown function. Interestingly, in 5 of the 14 mutants, the Tn5 insertion was interrupting the coding sequence of *ntrY* (*smc01044*) at three different positions (representative mutants GRS2175, GRS1980, and GRS577) (Fig. 1B). Here, we report on the characterization of GRS577.

Some of the free-living phenotypes shown by the GRS577 transposant were similar to those reported for an *ntrX* insertion

mutant derived from strain Rm1021 (Wang et al. 2013). Thus, GRS577 was defective in swimming motility (Fig. 2A) and produced fewer flagella (0.6 ± 0.2) than the parental strain GR4 (2.6 ± 0.2) (Fig. 2B). Additionally, GRS577 exhibits a different cell morphology compared with GR4. GRS577 cells were smaller and more spherical than WT cells (cell lengths of 1.66 ± 0.06 and 1.94 ± 0.06 μm , respectively) and they tended to form clusters (Fig. 2B). The altered morphology of GRS577 cells is suggestive of envelope defects. Sensitivity tests performed using sodium dodecyl sulfate (SDS) as a membrane stressor revealed increased sensitivity of the mutant to the detergent (Fig. 2C). Furthermore, GRS577 showed a mucoid appearance in MM and bright fluorescence on MM supplemented with the fluorescent stain Calcofluor (Fig. 2D), suggesting the overproduction of EPS I. This phenotype was nutrient dependent because it was not observed in rich tryptone yeast (TY) medium. Inactivation of the *exoY* gene, essential for EPS I biosynthesis, abolished the mucoid and fluorescent phenotypes associated with the *ntrY*:Tn5 mutation, demonstrating that succinoglycan overproduction was responsible for those traits (Fig. 2E).

Surprisingly, in contrast to the Rm1021 *ntrX* insertion mutant obtained by Wang et al. (2013), GRS577 was able to establish

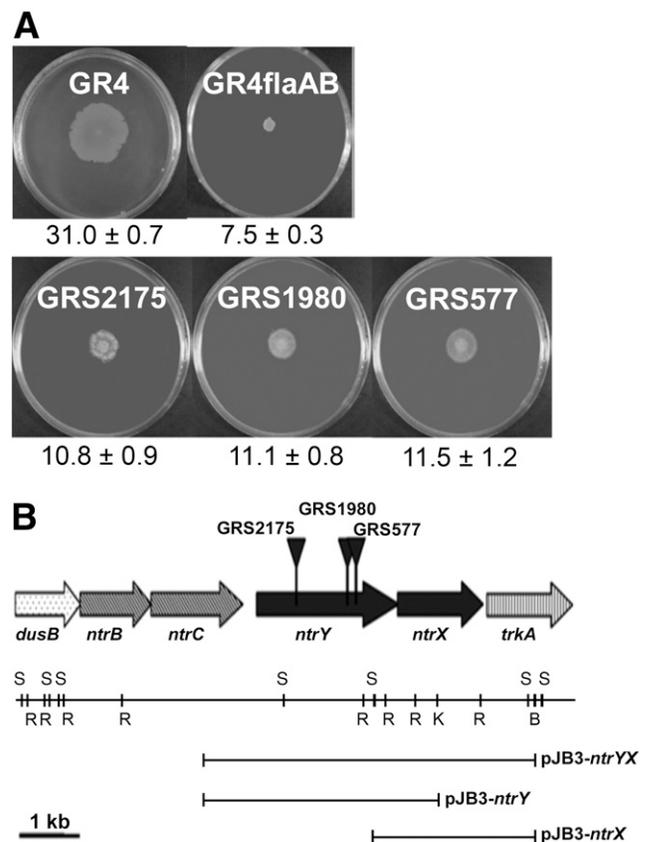


Fig. 1. Isolation and genetic characterization of *Sinorhizobium meliloti* GR4 transposon-induced mutants defective in surface motility. **A**, Surface motility exhibited by the wild-type strain GR4, the nonflagellated derivative strain GR4flaAB, and three transposon-induced mutants with reduced surface translocation. Pictures were taken 24 h after inoculation. Under each image, the mean and standard error of the migration zones (given in millimeters) obtained from at least 12 measurements taken from three independent experiments are indicated. **B**, Genomic context of the *S. meliloti ntrY* gene. The Tn5 insertion of mutants GRS2175, GRS1980, and GRS577 is indicated with triangles. Segments under the physical map indicate the genomic DNA region present in plasmid constructs used in complementation experiments. Restriction sites shown are *EcoRI* (R), *SphI* (S), *KpnI* (K), and *BamHI* (B).

efficient symbiosis with alfalfa plants (Supplementary Fig. S1). No significant differences were observed in shoot dry weight of plants inoculated with the mutant compared with that of plants inoculated with the parental strain GR4 (data not shown). Likewise, no differences could be detected in either the morphology or number of nodules developed by plant roots inoculated with GR4 or the GRS577 mutant.

Both NtrY and NtrX participate in the control of motility and EPS I production in *S. meliloti* GR4.

Experimental as well as in silico data indicate that the *ntrY* and *ntrX* genes are cotranscribed in *S. meliloti* (Schlüter et al. 2013; Wang et al. 2013). In order to examine a possible effect on downstream gene expression caused by the Tn5 insertion in GRS577, transcript levels of *ntrX* were analyzed by reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). Data revealed approximately 10-fold lower gene expression in the mutant than in the parental strain GR4 (Table 1). Likewise, transcript levels of *ntrY* sequences located downstream of the Tn5 insertion (*ntrYDT*) showed sixfold reduction in GRS577 compared with those in GR4. These results demonstrate that the transposon present in GRS577 was interrupting the transcription not only of the *ntrY* gene but also that of the downstream *ntrX* gene. Transcription levels of *ntrY* sequences located upstream of the Tn5 insertion (*ntrYUT*) were also analyzed and found to be sevenfold higher in GRS577 than in GR4. These expression data suggest that the NtrY/NtrX system directly or indirectly auto-regulates its own expression in *S. meliloti*.

In order to determine whether the different phenotypes shown by GRS577 were due to effects caused by the transposon in *ntrY*, *ntrX*, or both genes, complementation experiments were carried out. Thus, different pJB3-derived plasmid constructs harboring either *ntrY*, *ntrX*, or both genes (Fig. 1B) were

transferred to GRS577 and the motility, mucoidy, fluorescence, and SDS sensitivity phenotypes of the corresponding transconjugants were examined for complementation. Only strain 577JYX, which harbors the pJB3-*ntrYX* construct, regained virtually all WT phenotypes (Fig. 3). To rule out the possibility that the absence of phenotypic complementation in GRS577 transconjugants harboring the pJB3-*ntrX* plasmid (strain 577JX) could be caused by impaired *ntrX* transcription, expression analysis were performed by RT-qPCR. Results showed that compared with the WT strain carrying the empty vector (GR4J), transcription of *ntrX* was decreased in 577J (average relative expression of -3.6 with a standard error of ± 0.9) but it was increased in 577JX (average relative expression of +33.7 with a standard error of ± 5.3). Therefore, our complementation studies suggest that in *S. meliloti* GR4, both genes, *ntrY* and

Table 1. Relative expression of different genes in GRS577 compared with the wild-type strain GR4

Gene	Relative expression ^a
<i>ntrX</i>	-9.9 \pm 2.0
<i>ntrYDT</i> ^b	-6.0 \pm 1.2
<i>ntrYUT</i> ^b	7.0 \pm 0.8
<i>visN</i>	-8.1 \pm 0.9
<i>flaA</i>	-42.3 \pm 8.8
<i>exoY</i>	14.7 \pm 1.8

^a Fold changes in gene expression obtained from reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction experiments. The *smc03224* gene coding for 16S ribosomal RNA was used as an internal control. Mean values and standard errors were calculated from at least two independent experiments with three technical replicates. The minus sign (-) indicates a decreased fold change in GRS577.

^b *ntrYDT* and *ntrYUT* correspond to *ntrY* sequences located downstream and upstream of Tn5, respectively.

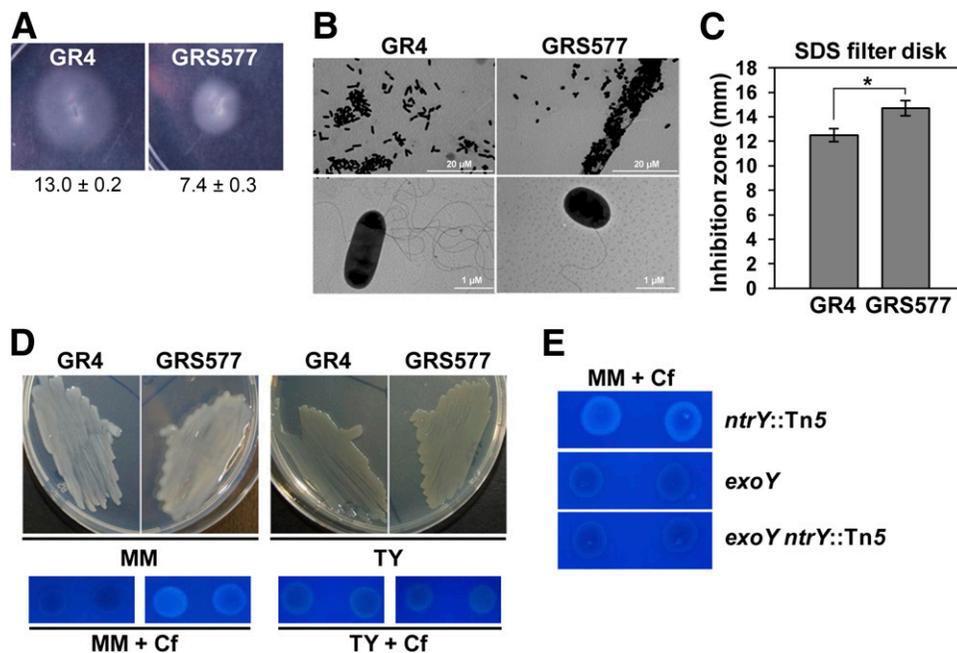


Fig. 2. A, Swimming motility assay of the wild-type strain GR4 and the *ntrY*::Tn5 mutant GRS577. Pictures were taken 72 h after inoculation. Under each image, the mean and standard error of the migration zones (given in millimeters) obtained from at least 12 measurements taken from three independent experiments are indicated. B, Transmission electron microscopy images showing the morphology and flagella production of wild-type and mutant cells grown on semisolid minimal medium (MM) for 24 h. Scale bars are indicated. C, Sodium dodecyl sulfate (SDS) sensitivity test. Bars represent the mean of the growth inhibition (in millimeters) of GR4 and GRS577 caused by the presence of a filter disk soaked with 10% SDS. Asterisk indicates significant differences according to an analysis of variance test ($P < 0.05$). D, Mucoid appearance (upper) and fluorescence (lower) exhibited by wild-type and mutant strains after growth on MM (left) or tryptone yeast (TY) (right) plates. To observe fluorescence after UV radiation, plates were supplemented with Calcofluor (Cf). E, Fluorescence shown by single *ntrY*::Tn5 (GRS577) and *exoY* (GR4Y) mutants and the double *exoY ntrY*::Tn5 (GR4YntrY) mutant grown on MM plates supplemented with Cf.

ntrX, participate in the coordinated control of motility and succinoglycan production, as well as in resistance to membrane stressors.

In parallel to complementation experiments, and in order to determine the function of the NtrY/NtrX module in *S. meliloti* GR4, we tried to obtain the single *ntrY* deletion mutant as well as a double *ntrYntrX* deletion mutant. However, several attempts following standard allelic exchange techniques used routinely in *S. meliloti* were unsuccessful. According to Wang et al. (2013), NtrX but not NtrY is essential for the viability in strain Rm1021. To test the possibility that deletion of the *ntrY* gene could be lethal for strain GR4, the allelic exchange procedure was performed in strains carrying one of the different

plasmids used in our complementation experiments. Deletion of the *ntrY* gene was achieved only in strains harboring the pJB3-*ntrYX* construct but not in those harboring the empty vector or the constructs carrying *ntrY* or *ntrX* alone. Similar results were obtained when the same strategy for allelic replacement was used in the Rm1021 genetic background. It should be mentioned that, when allelic replacement was attempted in cells harboring pJB3-*ntrY*, some of the clones lacked the WT chromosomal allele (Supplementary Fig. S2, lane 5); however, the lack of signal corresponding to the pJB3-borne *ntrY* sequences, together with the presence of signals showing the expected size for the deleted version of *ntrY* but too intense to be chromosomal borne, was suggestive of *ntrY* sequence rearrangements within cells. These data indicate that, under our experimental conditions, deletion of the complete *ntrY* gene sequence but not interruption by a transposon insertion is lethal in both GR4 and Rm1021 strains.

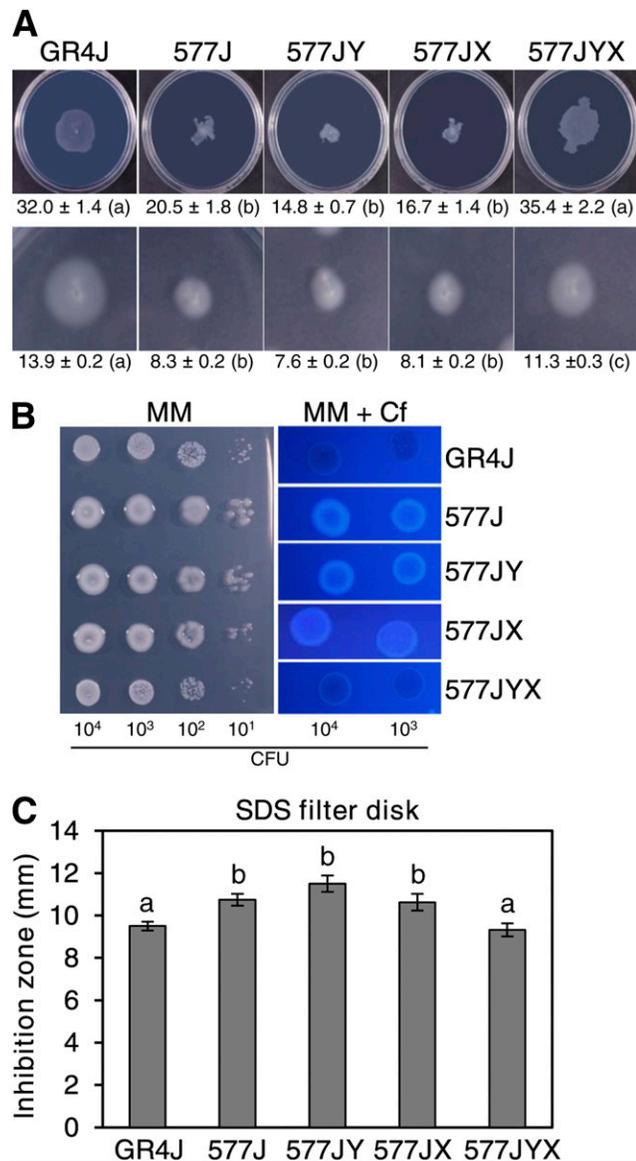


Fig. 3. Complementation of motility, exopolysaccharide I production, and sodium dodecyl sulfate (SDS) tolerance in GRS577. **A**, Surface motility (upper row) and swimming (lower row) assays. Under each image, the mean and standard error of the migration zones (given in millimeters) obtained from at least 18 measurements are indicated. Different letters indicate significant differences according to an analysis of variance test ($P < 0.05$). **B**, Mucoid appearance (left) and fluorescence (right) exhibited by different strains on minimal medium (MM) and MM supplemented with Calcofluor (Cf). The number of CFU that were plated in each lane is indicated. **C**, Growth inhibition caused by the presence of filter disks soaked with 10% SDS. Different letters indicate significant differences (t test, $P < 0.05$).

GRS577 exhibits increased biofilm formation and high sensitivity to salt stress.

It is known that *S. meliloti* EPS I overproducers exhibit greater biofilm formation on abiotic surfaces (Fujishige et al. 2006). In agreement with this, GRS577 showed an increased ability to develop biofilms on glass surfaces compared with the WT strain GR4 (Fig. 4A). Only the pJB3-*ntrYX* construct was able to suppress the increased biofilm formation ability shown by the GRS577 mutant, whereas plasmid constructs containing either only *ntrY* or only *ntrX* did not. Abolition of EPS I synthesis in GR4YntrY (*exoY* and *ntrY*) reduced the amount of bacteria attached to glass surfaces to levels similar to those shown by the WT (Fig. 4A), indicating that EPS I overproduction was responsible for the increased biofilm formation ability exhibited by the mutant.

On the other hand, *ntrY* was identified as a gene involved in salt tolerance in the bean symbiont *R. tropici* CIAT899 (Nogales et al. 2002). Here, we show that the mutation present in GRS577 prevents the growth of *S. meliloti* in MM supplemented with 300 mM NaCl (Fig. 4B). Similar to the previously described phenotypes shown by GRS577, only introduction of the plasmid-borne *ntrYX* genes could rescue bacterial growth in the presence of high salt concentrations, assigning a role for the NtrY/NtrX regulatory system in salt tolerance in free-living bacteria.

Motility defects in GRS577 hinder alfalfa root colonization and decrease competitive nodulation.

As already mentioned, GRS577 was able to develop nitrogen-fixing nodules in alfalfa plants. Because rhizobial motility has been associated with nodulation efficiency and competitiveness, we decided to investigate whether these symbiotic phenotypes were altered in the *ntrY::Tn5* mutant, which was highly defective in flagellar synthesis and motility. In single inoculation experiments, GRS577 exhibited nodule formation efficiency similar to that of the WT strain GR4 (data not shown). However, in competition assays in which the mutant and WT strains were coinoculated in a 1:1 ratio, the mutant occupied approximately 50% fewer nodules than the WT (Fig. 5A). When inoculated in a 10:1 ratio (mutant/WT), the percentage of nodules occupied by the mutant was only 29%, revealing its low ability to compete with GR4 for the nodulation of alfalfa plants (Fig. 5A). Complementation of the GRS577 mutant with pJB3-*ntrYX* restored its ability to compete with the WT (Fig. 5A). To gain further insights into the reasons for the low competitive ability shown by GRS577, the transposant's capacity to adhere to and colonize alfalfa roots was examined. No significant differences in initial attachment (2 h postinoculation) were detected between GR4 and GRS577 (Fig. 5B). However, with longer incubation periods, a clear difference in alfalfa rhizosphere colonization was

observed, with the WT developing 10- to 100-fold more cells per gram of root tissue than GRS577 (Fig. 5B). This result indicates that the mutant was severely impaired in root colonization, which could give a clear advantage to the WT for nodule occupation in competition assays.

The motility impairment caused by reduced flagella production in GRS577 could be at least partially responsible for the poor root colonization shown by the mutant. We reasoned that, by increasing flagella production, nodule competitiveness could be rescued. Overexpression of the motility master regulator VisNR in GRS577 (strain 577TNR) increased the flagella number per cell and significantly improved the mutant's swimming and surface motilities, reaching levels similar to those shown by GR4 (Supplementary Fig. S3). Competition assays performed on alfalfa plants revealed that overexpression of VisNR was sufficient to recover the competitive nodulation ability of GRS577 to WT levels (Fig. 5A), indicating that the reduced competitiveness for nodule occupancy shown by the mutant was the result of an impaired bacterial motility.

Transcriptome analysis of GRS577.

In order to uncover genes that could potentially be regulated by the NtrY/NtrX system in *S. meliloti* GR4, the transcriptomes of GRS577 and WT GR4 cells grown in MM broth to mid exponential phase were compared. In total, 231 genes appeared as differentially expressed: 143 (62%) were downregulated whereas 88 (38%) were upregulated in GRS577 (Supplementary Table S1). Interestingly, an uneven distribution among the *S. meliloti* replicons was found for the up- and downregulated genes. Thus, 47.6% (68 of 143) of the genes showing lower expression in the mutant compared with the WT were located on

megaplasmid pSymA, whereas 40.9% (36 of 88) of the upregulated genes belonged to megaplasmid pSymB, percentages which are significantly higher than the 21 and 25%, respectively, expected for an even distribution among the *S. meliloti* replicons. These results suggest that, under free-living conditions, the NtrY/NtrX system of *S. meliloti* promotes expression of genes located on pSymA whereas it represses genes located on pSymB, an effect that could be either direct or indirect.

Among the downregulated genes in the GRS577 mutant, three major groups could be distinguished: the largest group comprised a total of 51 genes (35%) that code for hypothetical proteins of unknown functions; a second group contained 33 genes (23%) related to chemotaxis and flagellar motility and included class IA and IB transcriptional regulators *visN* and *rem*, respectively (Rotter et al. 2006; Sourjik et al. 2000); finally, a third group encompassed 28 pSymA-located genes (19%) whose expression is induced in response to microaerobic conditions. Within the last group, the following genes were found: 9 genes involved in the denitrification pathway (*nosR* and the complete *nosZDFYLX* operon coding for the dissimilatory nitrous oxide reductase, as well as the first gene of the operons coding for a periplasmic nitrate reductase [*napE*] and nitric oxide reductase [*norE*]); 2 genes related to the denitrification process (*azul* and *hemN*) (Torres et al. 2014), 14 different *fix* genes, including copies 1 and 2 of the *fixNOQP* operon that encode the high-affinity *cbb₃* oxidase required for respiration in the microoxic environment of the nodule (Bobik et al. 2006; Torres et al. 2013); and the *arcA1-arcB-arcD* genes of the arginine deiminase pathway, which is a widespread anaerobic route for arginine degradation (Bobik et al. 2006). It is also worth mentioning the downregulation of several genes responsible for tolerance to

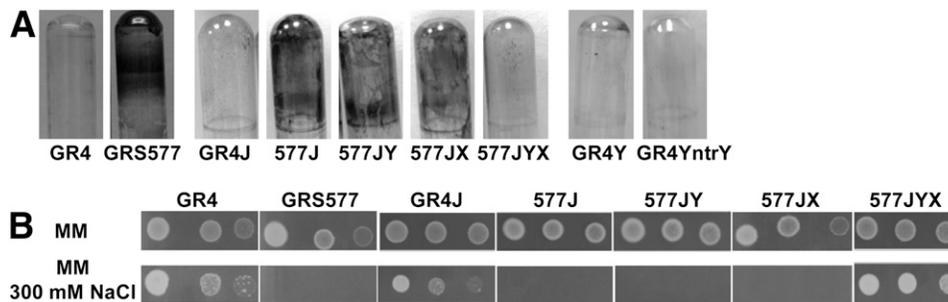


Fig. 4. A, Biofilm formation on glass tubes exhibited by *Sinorhizobium meliloti* strains in minimal medium (MM) broth. **B,** Ability of *S. meliloti* strains to grow in MM supplemented with 300 mM NaCl. Drops containing approximately 10^6 , 10^5 , and 10^4 CFU (from left to right) of each strain were applied onto the surface of MM (upper row) or MM supplemented with 300 mM NaCl (lower row) and incubated at 28°C for 3 days. A representative example of at least three experiments is shown.

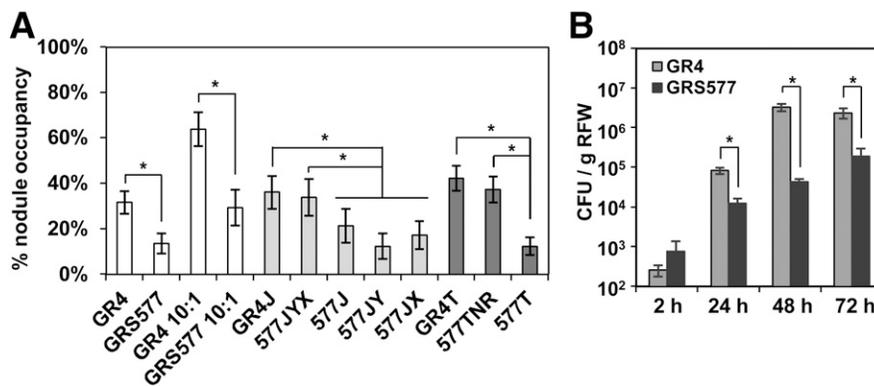


Fig. 5. A, Competitive nodulation assays. Data represent the percentage of nodules occupied by each rhizobial strain after coinoculation with the marked strain GR4 (pGUS3) in a mixture ratio of 1:1 (unmarked/pGUS3-marked) or 10:1 (indicated). **B,** Adsorption or colonization assays. Bars represent CFU counts recovered from alfalfa roots at different times after inoculation. Data are expressed per gram of root fresh weight (RFW). Error bars indicate the standard error from the mean obtained from three independent experiments. Asterisks indicate significant differences according to an analysis of variance test ($P < 0.05$).

different stresses: *gst13*, *clpB*, and heat- and cold-shock proteins, which could indicate that the mutant has a diminished capacity to cope with adverse environmental conditions. In addition, the presence of *ntrX* within the group of downregulated genes in the GRS577 transcriptome confirmed our results obtained by RT-qPCR that were mentioned above.

As observed for the group of downregulated genes, many of the upregulated genes (34%) in the *ntrY::Tn5* transposant code for hypothetical proteins of unknown function. In addition, the upregulation of 11 *exo* genes responsible for EPS I synthesis (*exoY*, *exoQ*, *exoZ*, *exoH*, *exoN*, *exoO*, *exoP*, *exoU*, *exoV*, and *exoW*) and depolymerization (*exoK*) (Janczarek 2011) was remarkable, a finding which is consistent with EPS I overproduction. The upregulation of several genes predicted to encode structural components of the cell envelope and cell-wall-modifying enzymes (*lysM*, *murF*, *mrcA2*, *ampC*, *rlpA*, *ropB1*, *sma2295*, and *smc04236*) was also noteworthy. Confirming our previous data obtained by RT-qPCR (Table 1), the *ntrY* gene appeared among genes significantly overexpressed in GRS577 compared with the WT GR4 strain.

In addition to for the already mentioned *ntrY* and *ntrX* genes, the microarray results of this study were further validated by confirming the differential expression of *visN*, *flaA*, and *exoY* by RT-qPCR (Table 1).

S. meliloti NtrY/NtrX regulates expression of denitrification and *nifA* genes.

In *S. meliloti*, expression of denitrification genes (*nap*, *nir*, *nor*, and *nos* genes that encode the corresponding reductases for nitrate, nitrite, nitric oxide, and nitrous oxide, respectively) is induced under microaerobic conditions (2% O₂) and in the presence of nitrate (Becker et al. 2004; Torres et al. 2014). Although our transcriptomic study was performed with cells grown in well-aerated cultures and in the absence of nitrate, reduced expression of some denitrification genes (*napE*, *norE*, *nosR*, and *nosZDFYLX*) was detected in the GRS577 mutant compared with the WT. Interestingly, the NtrY/NtrX TCS of *Brucella* spp. has been involved in the induction of nitrate respiration enzymes under microaerobic conditions (Carrica et al. 2012). This prompted us to investigate whether NtrY/NtrX could play a similar role in *S. meliloti*. Using transcriptional fusions to the *lacZ* reporter gene, we analyzed the expression of *nirK* (for nitrite reductase) and *norB* (for nitric oxide reductase) in *S. meliloti* GR4 and GRS577 cells after growth in liquid MM or MM supplemented with KNO₃ under aerobic and microaerobic conditions (2% O₂). In addition, β-galactosidase activity of WT and mutant cells containing either plasmid pCHK57 (*pnifA::lacZ*) or pGD499 (*pnprt::lacZ*) were also measured as controls for microaerobic induction and

constitutive gene expression, respectively. No significant differences between GR4 and GRS577 were detected concerning the expression of the constitutive *npt* promoter under any of the four experimental conditions tested (data not shown), thereby ruling out the existence of unspecific effects on gene expression. Under microaerobic conditions, the expression of the *nifA* gene increased eightfold in WT GR4 cells grown in MM, compared with the expression observed under aerobic conditions (Fig. 6A). In microaerobiosis, the presence of nitrate in culture medium reduced by approximately half the levels of *nifA* gene expression in GR4. This negative effect of nitrate on *S. meliloti* *nifA* expression under free-living microaerobic conditions has already been described previously (Fischer 1994; Noonan et al. 1992). In microaerobiosis and in the absence of nitrate, *nifA* expression levels in GRS577 were more than twofold lower than those observed for GR4 and, interestingly, they were not affected by the presence of nitrate (Fig. 6A). These results suggest that, under microaerobic conditions, the NtrY/NtrX system is required to achieve maximum expression of *nifA* in the absence of nitrate.

In the absence of nitrate, the expression of *norB* and *nirK* increased in both GR4 and GRS577 in response to microaerobiosis, reaching similar levels (Fig. 6B and C). The presence of nitrate under microaerobic conditions increased significantly the expression of *norB* (3-fold) and *nirK* (10-fold) in GR4 cells. Interestingly, although the presence of nitrate also induced expression of *norB* and *nirK* in GRS577 grown in microaerobiosis, expression levels of these genes were significantly reduced (1.7- and 2.7-fold lower, respectively) compared with those observed in the WT GR4 grown under the same conditions (i.e., microaerobiosis and in the presence of nitrate). These results suggest that the NtrY/NtrX system is responsible for maximum expression of some denitrification enzymes in microaerobiosis when nitrate is present.

DISCUSSION

In this work, characterization of a surface motility-deficient mutant (GRS577) has extended the knowledge about the complex role played by the TCS NtrY/NtrX in the alfalfa symbiont. Our data indicate that, although not essential for establishing nitrogen-fixing symbiosis, both *ntrY* and *ntrX* genes act together to regulate important traits in *S. meliloti*. Both genes are required for the expression of flagellar genes, control of EPS I production, cell envelope integrity, tolerance to salt stress, alfalfa root colonization, and competitive nodulation. In addition, the NtrY/NtrX system is required for optimal expression of nitrogen metabolism genes (*nifA* and denitrification genes) under microaerobic conditions.

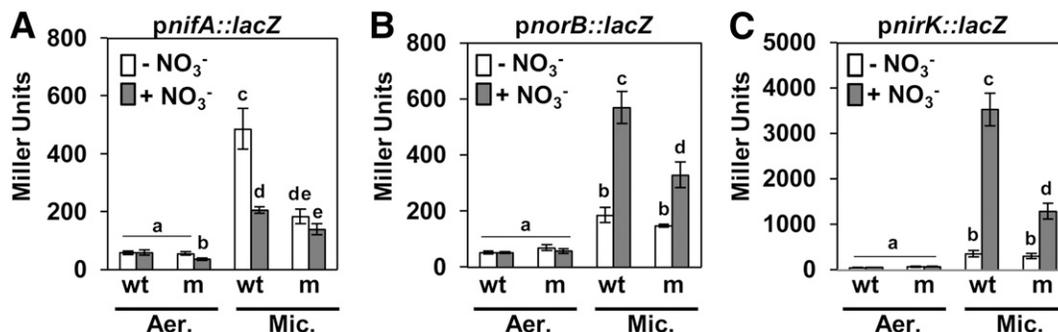


Fig. 6. Expression of transcriptional fusions to *lacZ* of the **A**, *nifA*; **B**, *norB*; and **C**, *nirK* genes in *Sinorhizobium meliloti* GR4 (wt) and its derivative mutant GRS577 (m). The activity of *nifA*, *norB*, and *nirK* promoter regions was measured in both strains after growth in liquid minimal medium (MM) (white bars) and MM supplemented with 10 mM KNO₃ (gray bars) under aerobic (Aer.) and microaerobic (Mic.) conditions. Results are the mean of three biological independent experiments with two technical replicates. Error bars represent standard errors. Different letters indicate significant differences according to an analysis of variance test ($P < 0.05$).

Some of the conclusions reached in our study are significantly different from those reported recently concerning the role of NtrY/NtrX in *S. meliloti* strain Rm1021 (Wang et al. 2013). In Rm1021, NtrX (but not the histidine kinase NtrY) was suggested to be involved in motility, production of EPS I, and symbiotic nitrogen fixation. Deletion of the *ntrX* gene was found to be lethal. Hence, results reported by Wang et al. (2013) were obtained using a plasmid insertion mutant which exhibited decreased *ntrX* expression. In GRS577, the Tn5 insertion disrupts the coding sequence of the *ntrY* gene and also leads to reduced *ntrX* expression levels. The decrease in *ntrX* transcription detected in GRS577 is similar to that reported for the Rm1021 *ntrX* plasmid insertion mutant (10 and 14% of the *ntrX* transcriptional activity detected in GR4 and Rm1021, respectively). Wang and coworkers (2013) could restore the EPS I production and symbiotic phenotype of their *ntrX* insertion mutant with a plasmid carrying the *ntrX* gene under the control of the *lac* promoter. In agreement with a role for the *ntrY* gene, we could not complement GRS577 phenotypes using the plasmid construct pJB3-ntrX that allowed expression of the *ntrX* gene from a *lac* promoter, as shown by RT-qPCR. Likewise, the construct pJB3-ntrY failed to complement the mutant. Only the pJB3-ntrYX construct, which expresses both *ntrY* and *ntrX* genes, restored the different phenotypes exhibited by GRS577. These results indicate that both *ntrY* and *ntrX* participate in the control of the different observed phenotypes.

According to Wang and coworkers (2013), *ntrY* is dispensable in Rm1021 and an *ntrY* deletion mutant behaves as the WT. However, under our experimental conditions, deletion of the chromosomal *ntrY* gene in either GR4 or Rm1021 strains by using standard allelic exchange techniques could only be achieved in the presence of the pJB3-ntrYX plasmid. Hybridization experiments revealed that, in the absence of pJB3-ntrYX, some colonies resulting from allelic replacement selection contained unexpected rearrangements affecting *ntrY* sequences. These rearrangement phenomena could have escaped Wang and coworkers (2013) because their mutants were checked only by PCR. Curiously, attempts to obtain *ntrY* and *ntrX* mutants in *Azospirillum brasilense* by double crossover events were also unsuccessful (Ishida et al. 2002). Although, in that study, potential candidates were obtained, hybridization analyses revealed that the cassette was inserted in a site different from the *ntrY* gene. Taking into account these and our own attempts to delete *ntrY*, there is a possibility that the *ntrY* gene might still be present in the mutant obtained in Rm1021. Unfortunately, the mutations published by Wang et al. (2013) could not be tested under our experimental conditions. Our results indicate that complete deletion of *ntrY* compromises cell viability in *S. meliloti*.

GRS577 exhibits a pleiotropic phenotype. The decreased *visNR* expression and upregulation of *exo* genes are responsible for its impaired flagella-dependent motility and EPS I overproduction phenotypes. Moreover, compared with the parental strain, the mutant exhibited an increased ability to form biofilm on glass surfaces, a behavior that was demonstrated to be linked to EPS I overproduction. GRS577 shows increased salt sensitivity compared with the WT strain, a phenotype that was also described for an *ntrY* mutant of the bean symbiont *Rhizobium tropici* (Nogales et al. 2002). The altered morphology and increased sensitivity to membrane stressors shown by GRS577 suggest that the NtrY/NtrX system might be involved in maintaining cell envelope integrity. In agreement with this, the transcriptome profiling of the transposant revealed differential expression of several genes coding for predicted structural components of the cell envelope and cell-wall-modifying enzymes. Therefore, NtrY/NtrX adds to the increasing group of regulatory proteins identified in *S. meliloti* such as Emm, ExoR-ExoS/ChvI, or CbrA that coordinately control critical cell

processes, including motility, EPS production, and free-living viability (Gibson et al. 2007; Morris and González 2009; Wang et al. 2010). Curiously, expression of the *chvI* gene was increased in GRS577 compared with the WT strain. However, a possible interaction between the NtrY/NtrX and the ExoR-ExoS/ChvI systems has not been investigated further in this study.

Importantly, we show that GRS577 establishes symbiosis with alfalfa as efficiently as the WT. The Rm1021 *ntrX* plasmid insertion mutant was shown to be defective in symbiotic nitrogen fixation in alfalfa plants, although *nifA* or *nifH* expression remained unaffected (Wang et al. 2013). The nature of the mutations harbored by the two mutant strains could explain their different symbiotic phenotypes. Very slight expression of *ntrX* in GRS577, possibly from a promoter internal to Tn5, might be enough to support efficient symbiotic nitrogen fixation. Another possible explanation for the different symbiotic phenotypes exhibited by these two mutants, both of which are affected in the NtrY/NtrX system, is that the disruption of the normal functioning of just one mutant or the two components of the NtrY/NtrX system leads to different phenotypes. This effect, which could be the result of cross-talk between the NtrY/NtrX and the upstream-lying NtrB/NtrC regulatory systems, has been described in *Azorhizobium caulinodans* (Pawlowski et al. 1991). In this bacterium, free-living N fixation is more severely affected by the removal of one activator protein (NtrC or NtrX) than by the removal of the complete system (NtrY/NtrX). To solve the discrepancies, the Rm1021 *ntrX* plasmid insertion mutant needs further genetic examination.

Data in the literature about transcriptional regulation of *ntrY* and *ntrX* genes is scarce. In *A. caulinodans*, *ntrYX* expression was shown to be dependent on *ntrC* when cells were grown on nitrate (Pawlowski et al. 1991). In *Rhodobacter capsulatus* and *Brucella abortus*, transcription of *ntrY* starts within the *ntrC-ntrY* intergenic region but may also be transcribed from another promoter upstream of *nifR3-ntrB-ntrC* (Carrica et al. 2012; Drepper et al. 2006). To the best of our knowledge, there is no evidence indicating that *S. meliloti ntrYX* might be transcribed from a promoter upstream of *dusB-ntrB-ntrC*. Transcript start site (TSS) mapping in *S. meliloti* did not reveal any TSS upstream of *dusB-ntrB-ntrC*, although one TSS upstream of the start codon of *ntrC* was mapped in addition to several TSS within the intergenic *ntrC-ntrY* region (Schlüter et al. 2013). Recently, in *B. abortus*, NtrX has been shown to repress transcription by binding sequences in the *ntrC-ntrY* intergenic region (Fernández et al. 2017). Our gene expression analyses suggest that the NtrY/NtrX system of *S. meliloti* is autoregulated. Interestingly, a DNA sequence resembling the *B. abortus* NtrX binding site could be identified upstream of *ntrY* overlapping two putative TSS (Supplementary Fig. S4). The possibility that *S. meliloti* NtrX can directly repress transcription of *ntrYX* requires further investigation.

Although no apparent deficiencies in symbiotic nitrogen fixation were associated with GRS577, this strain exhibited a reduced ability to compete with the WT strain for nodule occupancy. We have demonstrated that this behavior is the result of the motility impairment because overexpression of the flagellar VisNR master regulator was sufficient to complement bacterial competitiveness. Therefore, this study supports the notion that, although motility is not essential for nodulation and N fixation, it affects root colonization, a trait that can affect the establishment of symbiosis, especially when competing with other microorganisms.

The gene expression analyses performed in this work indicate that, in *S. meliloti*, the NtrY/NtrX system participates in fine-tuning nitrogen metabolism gene expression in response to specific environmental conditions. Under microaerobic conditions, when nitrate is absent, the system leads to maximum expression of the *nifA* gene, whereas maximum expression of

denitrification genes requires the presence of nitrate. The negative effect of nitrate on *S. meliloti nifA* expression under free-living microaerobic conditions has been described previously (Fischer 1994; Noonan et al. 1992); however, this is the first time that the NtrY/NtrX system has been associated with this effect. Likewise, it was already known that the presence of nitrate and microaerobic conditions (2% O₂) can activate the expression of denitrification genes in *S. meliloti* (Torres et al. 2014). Our study links the NtrY/NtrX system to this process. Interestingly, the transcriptomic analyses of the GRS577 mutant also revealed the downregulation of several *fixNOQP* genes that encode the cytochrome *c* oxidase (*ccb₃*) with high affinity for O₂ (Bobik et al. 2006; Torres et al. 2013). A role for the NtrY/NtrX system in regulating the expression of nitrogen respiration enzymes and high-affinity cytochrome oxidase genes has already been described in the bacterial pathogen genera *Brucella* and *Neisseria* (Atack et al. 2013; Carrica et al. 2012, 2013) but not in the legume symbiont *S. meliloti*. Similar to these bacteria, the *S. meliloti* NtrY/NtrX system may contribute, together with other TCS such as ActSR (Fenner et al. 2004), to the adaptation to the microoxic conditions encountered during its symbiotic lifestyle within the root nodule.

In summary, this work has unveiled the role of the NtrY/NtrX system in controlling *S. meliloti* traits relevant for both free-living and symbiotic states. Oxygen tension and the presence of nitrate modulate its regulatory role. Under free-living conditions, the system contributes to salt tolerance and to maintain cell envelope integrity. In addition, it is responsible for increased bacterial motility and repression of succinoglycan production and biofilm formation. This allows rhizobial cells to achieve efficient root colonization and optimal nodulation competitive ability. Although the NtrY/NtrX system is dispensable for symbiotic nitrogen fixation, it contributes to microaerobic energy metabolism by inducing high-affinity cytochrome oxidases and fine tuning nitrogen respiration enzymes as well as the machinery for N-fixation.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.

Bacterial strains and plasmids used in this work and their relevant characteristics are listed in Table 2. *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani medium (Sambrook et al. 1989) at 37°C; *S. meliloti* strains were grown at 30°C in either

Table 2. Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics ^a	Reference or source
<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
GR4	Wild-type strain	Casadesús and Olivares 1979
GR4flaAB	GR4 <i>flaAflaB</i> ::Hyg, Hyg ^r	Bernabéu-Roda et al. 2015
GRS577	GR4 <i>ntrY</i> ::Tn5, Km ^r	This work
GRS2175	GR4 <i>ntrY</i> ::Tn5, Km ^r	This work
GRS1980	GR4 <i>ntrY</i> ::Tn5, Km ^r	This work
GR4Y	GR4 <i>ΔexoY</i>	This work
GR4YntrY	GR4Y containing the <i>ntrY</i> ::Tn5 mutation from GRS2175, Km ^r	This work
GR4J	GR4 containing plasmid pJB3Tc19, Tc ^r	This work
577J	GRS577 containing plasmid pJB3Tc19, Km ^r , Tc ^r	This work
577JY	GRS577 containing plasmid pJB3-ntrY, Km ^r , Tc ^r	This work
577JX	GRS577 containing plasmid pJB3-ntrX, Km ^r , Tc ^r	This work
577JYX	GRS577 containing plasmid pJB3-ntrYX, Km ^r , Tc ^r	This work
GR4T	GR4 containing plasmid pTE3, Tc ^r	This work
577T	GRS577 containing plasmid pTE3, Km ^r , Tc ^r	This work
577TNR	GRS577 containing plasmid pTE3-visNR, Km ^r , Tc ^r	This work
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>supE44, DlacU169, f80, lacZDM, 5hsdR171, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Bethesda Research Lab
S17-1	<i>thi, pro, recA, hsdR, hsdM, RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7</i>	Simon et al. 1983
Plasmids		
pUC18	Cloning vector, Ap ^r	Yanisch-Perron et al. 1985
pCR-XL-TOPO	Cloning vector, Km ^r	Invitrogen
pSUP202	pBR325::mob, Ap ^r , Tc ^r , Cm ^r	Simon et al. 1983
pSUP2021	pSUP202 derivative with Tn5, Ap ^r , Tc ^r , Cm ^r , Km ^r	Simon et al. 1983
pK18 <i>mobsacB</i>	Suicide plasmid, Km ^r	Schäfer et al. 1994
pK18- <i>ΔexoY</i>	pK18 <i>mobsacB</i> carrying the deleted version of the <i>exoY</i> locus, Km ^r	Nogales et al. 2012
pK18- <i>ΔntrY</i>	pK18 <i>mobsacB</i> carrying the deleted version of the <i>ntrY</i> locus, Km ^r	This work
pJB3Tc19	IncP cloning vector, Tc ^r , Ap ^r	Blatny et al. 1997
pTE3	IncP broad-host-range expression vector with <i>trp</i> promoter, Tc ^r	Egelhoff and Long 1985
pMP220	IncP transcriptional fusion vector, Tc ^r	Spaink et al. 1987
pGD499	<i>npt::lacZ</i> transcriptional fusion vector, Tc ^r	Ditta et al. 1985
pCHK57	<i>nifA::lacZ</i> transcriptional fusion vector, Tc ^r	Ditta et al. 1987
pTOPO-ntrYX	pCR-XL-TOPO carrying <i>S. meliloti ntrYX</i> genes, Km ^r	This work
pTOPO-visNR	pCR-XL-TOPO carrying <i>S. meliloti visNR</i> genes, Km ^r	This work
pUC-E2175	pUC18 carrying the <i>EcoRI</i> fragment that contains the <i>ntrY</i> ::Tn5 mutation of GRS2175; Ap ^r , Km ^r	This work
pSUP202-E2175	pSUP202 carrying the <i>EcoRI</i> insert of pUC-E2175, Ap ^r , Tc ^r	This work
pJB3-ntrYX	pJB3Tc19 with <i>S. meliloti ntrYX</i> genes cloned downstream from the <i>lacZ</i> promoter, Tc ^r	This work
pJB3-ntrY	pJB3-ntrYX derivative in which part of the <i>ntrX</i> coding sequence has been deleted, Tc ^r	This work
pJB3-ntrX	pJB3Tc19 with the <i>ntrX</i> gene cloned downstream from the <i>lacZ</i> promoter, Tc ^r	This work
pTE3-visNR	pTE3 derivative harboring <i>S. meliloti visNR</i> genes downstream from the <i>trp</i> promoter, Tc ^r	This work
pMP-Smnor	pMP220 derivative carrying a <i>norECB::lacZ</i> transcriptional fusion, Tc ^r	This work
pMP-Smnir	pMP220 derivative carrying a <i>nirK::lacZ</i> transcriptional fusion, Tc ^r	This work
pGUS3	Plasmid which contains an <i>nfeD::gusA</i> fusion, Km ^r	García-Rodríguez and Toro 2000

^a Hyg^r, Km^r Ap^r, Tc^r, and Cm^r, indicate hygromycin, kanamycin, ampicillin, tetracycline, and chloramphenicol resistance, respectively.

complex TY medium (Beringer 1974), Bromfield medium (BM) (0.04% tryptone, 0.01% yeast extract, and 0.01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), or MM (Robertsen et al. 1981). To detect the overproduction of EPS I, Calcofluor-White M2R (fluorescent brightener 28; Sigma-Aldrich) was added to TY or MM plates at a final concentration of 0.02%. Salt tolerance was determined by spot inoculation of 10-fold serial dilutions of each strain on solid MM plates supplemented with 300 mM NaCl. When required, antibiotics were added at final concentrations of ampicillin at $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, kanamycin at $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, and tetracycline at $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ for *E. coli*; and kanamycin at $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, tetracycline at $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, and hygromycin at $75 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ for *S. meliloti*. To improve reproducibility, all liquid cultures of *S. meliloti* were initiated from glycerol stocks.

Isolation of *S. meliloti* mutants with altered surface motility.

Transposon Tn5 mutagenesis of *S. meliloti* GR4 was carried out following the procedure described by Simon et al. (1983), using strain S17-1 carrying pSUP2021 as donor. After selection on MM plates supplemented with kanamycin, individual transposants were grown in liquid TY in a Bioscreen C apparatus to late logarithmic phase (optical density at 600 nm $[\text{OD}_{600}] = 0.9$ to 1). Each culture (2 μl) was applied onto the surface of MM plates containing 0.6% purified agar, allowed to dry for 10 min, and incubated overnight at 30°C. Those clones showing decreased surface motility relative to WT strain GR4 in three independent experiments were selected for further characterization. The point of insertion for Tn5 mutants was determined by arbitrary PCR, as described previously (Miller-Williams et al. 2006).

Construction of plasmids and *S. meliloti* strains.

Primers used to obtain the different plasmid constructs and *S. meliloti* mutant strains are listed in Supplementary Table S2.

For the construction of pJB3-ntrYX, a 5,070-bp fragment containing *S. meliloti* GR4 *ntrY* and *ntrX* genes as well as 484 bp of *ntrY* upstream sequences was amplified from genomic DNA using primers delntrYX.1 and delntrYX.4. The resulting PCR product was first cloned into pCR-XL-TOPO and sequenced, then subcloned as a *Bam*HI fragment into pJB3Tc19, keeping *ntrYntrX* transcription in the same orientation as *lacZ*. To obtain pJB3-ntrY, the pJB3-ntrYX plasmid was digested with *Kpn*I to remove a fragment of 1,620 bp containing the 3' half of the *ntrX* coding sequence. For the construction of pJB3-ntrX, a 2,590-bp *Sph*I fragment from pTOPO-ntrYX comprising the coding sequence of *ntrX* was isolated and subcloned into pJB3Tc19 in the same orientation as *lacZ*.

The pTE-visNR plasmid was constructed by cloning a 1,812-bp PCR fragment containing *visN* and *visR* into *Bam*HI-digested pTE3 vector, in the same orientation as the *trp* promoter. The fragment comprising the *visN* and *visR* genes and flanked by *Bgl*II linkers was PCR amplified using Rm1021 genomic DNA and primers visNR-U and visNR-R, cloned into pCR-XL-TOPO, and sequenced before subcloning into pTE3.

To obtain plasmids pMP-Smnr and pMP-Smnr harboring *norECB::lacZ* and *nirK::lacZ* transcriptional fusions, respectively, DNA fragments of 2,056 and 852 bp flanked by *Eco*RI linkers were PCR amplified using GR4 genomic DNA and primer pairs pnr.F/pnr.R and pnirK.F/pnirK.R. Each fragment was cloned into *Eco*RI-digested pMP220, and clones harboring the insert in the correct orientation relative to the *lacZ* gene were selected.

For the construction of the EPS I-defective strain GR4Y, plasmid pK18- Δ exoY (Nogales et al. 2012) was introduced into GR4 via conjugation with *E. coli* strain S17-1 and allele replacement was selected as described previously (Schäfer et al.

1994). To obtain the GR4YntrY strain, plasmid pSUP202-E2175 carrying the genomic *Eco*RI fragment harboring the *ntrY::Tn5* mutation present in GRS2175 was introduced into GR4Y by conjugation, and allele exchange was selected. The Tn5 insertions isolated in this study could not be transduced into GR4 due to unavailability of adequate phages for this *S. meliloti* strain.

The deleted version of *ntrY* was generated by overlap extension PCR using primers delntrY-1 to delntrY-4. The resulting fusion product, in which a deletion of 2.1 kb was created, was cloned into pCR-XL-TOPO and sequenced. Then, the insert was subcloned into vector pK18*mobsacB* as an *Eco*RI fragment, yielding plasmid pK18- Δ ntrY. This construction was introduced into the desired *S. meliloti* strains by conjugation and the allelic exchange was selected in the absence or presence of different pJB3-derived constructs.

All mutants obtained in this work were checked by Southern hybridization with specific probes.

Motility assays.

Except for the initial screening of transposants (see above), surface motility of *S. meliloti* strains was assayed essentially as described by Bernabéu-Roda et al. (2015). Briefly, *S. meliloti* cells grown in TY broth to late logarithmic phase ($\text{OD}_{600} = 1$ to 1.2) were pelleted, washed twice in MM, and resuspended in 0.1 volume of the latter medium. Aliquots of this bacterial suspension (2 μl , approximately 2×10^7 cells) were dispensed and allowed to dry for 10 min onto the surface of plates containing 20 ml of semisolid MM containing 0.6% Noble Agar Difco (BD), which were previously air dried at room temperature for 15 min. Surface migration was determined as the average length of the two sides of a rectangle able to exactly frame each colony. Swimming motility was examined on plates prepared with BM containing 0.3% Bacto agar and inoculated with 3- μl droplets of rhizobial cultures grown in TY ($\text{OD}_{600} = 1$). For swimming tests, the migration zone was determined as the colony diameter in millimeters after 72 h of incubation.

Transmission electron microscopy (TEM).

Cells for TEM observations were obtained from the edge of swarming colonies. Carbon-coated Formvar grids were placed for 5 min on top of a drop of water previously applied to the colony border. The grids were then washed twice in water for 1 min and stained with 2% (wt/vol) uranyl acetate for 3 min. Grids were allowed to air dry for at least 1 h and visualized using a JEOL JEM-1011 transmission electron microscope with a 100-kV beam at the Microscopy Service of the Estación Experimental del Zaidín, Granada, Spain. Images were captured using an Orius Gatan charge-coupled-device camera. Data presented for cell length and the number of flagella per cell are mean values and standard errors of at least 30 measurements.

SDS-sensitivity assays.

S. meliloti strains were grown in TY broth up to an OD_{600} of 0.9 to 1, then diluted to an OD_{600} of 0.2 in the same medium. The diluted cultures (100 μl) were inoculated in 3 ml of soft-agar TY (0.6%) and poured onto Petri plates containing 20 ml of the same solid medium. The overlay was allowed to solidify for 30 min. After that, a 5-mm paper disk was soaked with 5 μl of 10% SDS (wt/vol) and placed on the center of the plate. The diameter of growth inhibition was recorded after 48 h of incubation at 30°C.

Biofilm assays.

Stationary-phase cultures of *S. meliloti* strains grown in TY broth were washed with liquid MM and diluted 1:10 in glass

tubes containing 4 ml of fresh MM broth. Tubes were incubated for 48 h at 30°C under shaking conditions and for one additional week under static conditions at room temperature. After the incubation period, liquid from the tubes was removed by aspiration and bacterial biofilm stained with 8 ml of 0.1% crystal violet for 20 min. Tubes were washed carefully three times with deionized water to eliminate the excess of crystal violet, and air dried before pictures were taken.

RNA isolation and synthesis of cDNA.

Total RNA was isolated from 10 ml of MM broth cultures at midlogarithmic phase ($OD_{600} = 0.5$). Harvested cells were washed with 0.1% sarkosyl and pellets were immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction. RNA was isolated using the Qiagen RNeasy RNA purification kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Residual DNA was removed with RNase-free Dnase I Set (Roche). The quality of the RNA was checked by 1.4% agarose gel electrophoresis.

For microarray hybridizations, RNA samples were concentrated using Microcon-30 filters (Millipore), after which Cy3- and Cy5-labeled cDNA were prepared as previously described (Nogales et al. 2010) from 7.5 μg of total RNA.

Microarray hybridization, image acquisition, and data analysis.

Sml4kOLIGO microarrays, which are based on the Rm1021 genome, were purchased from A. Becker (University of Bielefeld, Bielefeld, Germany). Hybridizations with cDNA from GR4 strains were performed as described previously (Nogales et al. 2010). The genomes of GR4 and Rm1021 are similar but the latter lacks the two accessory plasmids pRmeGR4a and pRmeGR4b (Martínez-Abarca et al. 2013). For image acquisition, a GenePix 4100A Scanner (Axon Instruments, Inc.) was used. Quantifications of mean signal intensities for each spot were determined using the GenePix Pro software (Axon Instruments, Inc.). Normalization and *t* statistics were carried out using the EMMA 2.8 microarray data analysis software developed at the Bioinformatics Resource Facility Center for Biotechnology, Bielefeld University. Data were collected and analyzed from three independent biological replicates. Genes were regarded as differentially expressed if they showed a *P* value ≤ 0.05 , average signal to noise value ≥ 7 , and \log_2 experiment/control ratio value ≥ 1 or ≤ -1 . Detailed protocols and raw data resulting from the microarray experiments have been deposited in the ArrayExpress database with the accession number E-MTAB-2511.

RT-qPCR.

RNA (1 μg) was reverse transcribed using Superscript II RT (Invitrogen) and random hexamers (Roche) as primers. Real-time qPCR was performed on an iCycler iQ5 (Bio-Rad). Each 25- μl reaction contained 1 μl of either a 0 or 1:10000 dilution (for amplification of the 16S ribosomal RNA [rRNA] gene) of cDNA, 200 nM each primer, and the iQ SyBrGreen Supermix (Bio-Rad). Control PCR of the RNA samples not treated with RT were also performed to confirm the absence of contaminating genomic DNA. Samples were initially denatured by heating at 95°C for 3 min followed by a 35-cycle amplification and quantification program (95°C for 30 s, 55°C for 45 s, and 72°C for 45 s). A melting curve was conducted to ensure amplification of a single product. The oligonucleotide sequences for qPCR are listed in Supplementary Table S3. The efficiency for each primer pair (*E*) was determined by running 10-fold serial dilutions (four dilution series) of GR4 genomic DNA as template and generating a standard curve by plotting the log of the dilution factor against the cycle threshold (C_T) value during the amplification of each dilution. Amplification efficiency was

calculated using the formula $E = [10^{(1/\alpha)} - 1] \times 100$, where α is the slope of the standard curve. The relative expression of each gene was normalized to that of 16S rRNA and the analysis of the results was performed using the comparative critical threshold ($\Delta\Delta C_T$) method (Pfaffl 2001).

β -Galactosidase activity measurement.

Stationary-phase cultures of *S. meliloti* containing *lacZ* fusion plasmids grown in TY broth were washed and diluted 100-fold in 3 ml of either MM broth or MM broth supplemented with 10 mM KNO_3 . Tetracycline was added to all liquid cultures to ensure the maintenance of plasmid fusions. Cultures were incubated overnight at 30°C up to an $OD_{600} = 0.4$ to 0.6. After the incubation period, 100- μl aliquots of these cultures were used to determine β -galactosidase activity of cells grown under aerobic conditions. The remaining bacterial culture was subjected to microoxic conditions by gassing with 2% oxygen and 98% argon and incubated for 6 h at 30°C . β -Galactosidase activity was determined by the SDS-chloroform method described by Miller (1972).

Plant assays.

Alfalfa (*Medicago sativa* L. 'Aragon') plants were surface sterilized, germinated, and grown in hydroponic cultures under axenic conditions in glass tubes containing nitrogen-free nutrient solution, as previously described (Olivares et al. 1980). To test the degree of infectivity of each strain, 12-day-old plants (a total of 24 replicates, one plant per tube) were inoculated with 1 ml of a rhizobial suspension containing 5×10^6 cells. Prior to this inoculation, bacteria were grown to the exponential phase ($OD_{600} = 0.5$ to 0.6) in TY broth and diluted 100-fold in sterile water. After inoculation, the number of nodules per plant was daily recorded. To examine competitive ability, 12 individual plants grown as described for the infectivity test were inoculated with 1 ml of a bacterial suspension prepared as already described, containing mixtures at ratios 1:1 or 10:1 of the *S. meliloti* strain to be tested and GR4 marked with the pGUS3 plasmid. Roots were collected 15 days after inoculation, briefly washed with water, and incubated overnight in the dark at 37°C in 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-l-b-D-glucuronide (Apollo Scientific) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) with 1% SDS. Those nodules occupied by the strain harboring the pGUS3 plasmid stained blue; thus, nodule occupancy could be determined by counting blue and white nodules produced by each bacterial mixture in at least two independent experiments.

For adhesion and colonization assays, 1-week-old alfalfa plants (five plants in each tube) were inoculated with 1 ml of a rhizobial suspension as described above. At different times, 15 roots from each treatment were collected and washed three times with sterile distilled water, and pools of five plants were introduced to an Eppendorf tube containing 1 ml of sterile Tris-EDTA buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5] and 1 mM EDTA). Tubes were sonicated (2 \times for 1 min each) in a Selecta Ultrasons Q:2 sonicator bath. Released rhizobia were quantified by plate counting of serial dilutions of the supernatant, and means of the three determinations were plotted as the number of CFU per gram of root fresh weight.

To evaluate symbiotic nitrogen fixation of the different *S. meliloti* strains, alfalfa plants were grown in Leonard jars. One month after inoculation, the appearance and dry weight of the aerial part of plants as well as the aspect and number of nodules were compared.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BIO2010-18005 and BIO2013-42801-P from the Spanish Ministry MICINN/MINECO, CVI-03541 from

the Junta de Andalucía (Spain), and FEDER funds. J. Nogales was supported by a contract from MICINN (Spain) and N. Calatrava-Morales was supported by an FPU fellowship from MEC (Spain). TEM observations were carried out at the Microscopy service of the Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada, Spain. We thank M. J. Delgado and M. J. Torres for their help in establishing microoxic conditions, and P. van Dillewijn and L. Bernabéu for critical reading of the manuscript.

LITERATURE CITED

- Ames, P., and Bergman, K. 1981. Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 148:728-908.
- Atack, J. M., Srikhanta, Y. N., Djoko, K. Y., Welch, J. P., Hasri, N. H. M., Steichen, C. T., Vanden Hoven, R. N., Grimmond, S. M., Othman, D. S. M. P., Kappeler, U., Apicella, M. A., Jennings, M. P., Edwards, J. L., and McEwan, A. G. 2013. Characterization of an *ntrX* mutant of *Neisseria gonorrhoeae* reveals a response regulator that controls expression of respiratory enzymes in oxidase-positive proteobacteria. *J. Bacteriol.* 195:2632-2641.
- Becker, A., Bergès, H., Krol, E., Bruand, C., Rüberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., de Bruijn, F. J., Fourment, J., Francez-Charlot, A., Kahn, D., Küster, H., Liebe, C., Pühler, A., Weidner, S., and Batut, J. 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:292-303.
- Beringer, J. E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198.
- Bernabéu-Roda, L., Calatrava-Morales, N., Cuéllar, V., and Soto, M. J. 2015. Characterization of surface motility in *Sinorhizobium meliloti*: Regulation and role in symbiosis. *Symbiosis* 67:79-90.
- Blatny, J. M., Brautaset, T., Winther-Larsen, H. C., Haugan, K., and Valla, S. 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:370-379.
- Bobik, C., Meilhoc, E., and Batut, J. 2006. FixJ: A major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188:4890-4902.
- Bonato, P., Alves, L. R., Osaki, J. H., Rigo, L. U., Pedrosa, F. O., Souza, E. M., Zhang, N., Schumacher, J., Buck, M., Wassem, R., and Chubatsu, L. S. 2016. The NtrY-NtrX two-component system is involved in controlling nitrate assimilation in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1. *FEBS J.* 283:3919-3930.
- Caetano-Anollés, G., Wall, L. G., De Micheli, A. T., Macchi, E. M., Bauer, W. D., and Favelukes, G. 1988. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* 86:1228-1235.
- Caetano-Anollés, G., Wrobel-Boerner, E., and Bauer, W. D. 1992. Growth and movement of spot inoculated *Rhizobium meliloti* on the root surface of alfalfa. *Plant Physiol.* 98:1181-1189.
- Carrica, Mdel. C., Fernandez, I., Sieira, R., Paris, G., and Goldbaum, F. A. 2012. The NtrY/X two-component system of *Brucella* spp. acts as a redox sensor and regulates the expression of nitrogen respiration enzymes. *Mol. Microbiol.* 85:39-50.
- Carrica, Mdel. C., Fernandez, I., Sieira, R., Paris, G., and Goldbaum, F. A. 2013. The two-component systems PrrBA and NtrYX co-ordinately regulate the adaptation of *Brucella abortus* to an oxygen-limited environment. *Mol. Microbiol.* 88:222-233.
- Casadesús, J., and Olivares, J. 1979. Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 174:203-209.
- Cheng, Z., Lin, M., and Rikihisa, Y. 2014. *Ehrlichia chaffeensis* proliferation begins with NtrY/NtrX and PutA/GlnA upregulation and CtrA degradation induced by proline and glutamine uptake. *mBio* 5: e02141-14.
- Dilanji, G. E., Teplitski, M., and Hagen, S. J. 2014. Entropy-driven motility of *Sinorhizobium meliloti* on a semi-solid surface. *Proc. R. Soc. B* 281: 20132575.
- Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X. W., Finlay, D. R., Guiney, D., and Helinski, D. R. 1985. Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13:149-153.
- Ditta, G., Virts, E., Palomares, A., and Kim, C. H. 1987. The *nifA* gene of *Rhizobium meliloti* is oxygen regulated. *J. Bacteriol.* 169:3217-3223.
- Downie, J. A. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol. Rev.* 34:150-170.
- Drepper, T., Wiethaus, J., Giaourakis, D., Gross, S., Schubert, B., Vogt, M., Wiencek, Y., McEwan, A. G., and Masepohl, B. 2006. Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 258:250-256.
- Egelhoff, T. T., and Long, S. R. 1985. *Rhizobium meliloti* nodulation genes: Identification of *nodDABC* gene products, purification of *nodA* protein, and expression of *nodA* in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 164:591-599.
- Fenner, B. J., Tiwari, R. P., Reeve, W. G., Dilworth, M. J., and Glenn, A. R. 2004. *Sinorhizobium medicae* genes whose regulation involves the ActS and/or ActR signal transduction proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 236:21-31.
- Fernández, I., Cornaciu, I., Carrica, M. D., Uchikawa, E., Hoffmann, G., Sieira, R., Márquez, J. A., and Goldbaum, F. A. 2017. Three-dimensional structure of full-length NtrX, an unusual member of the NtrC family of response regulators. *J. Mol. Biol.* 429:1192-1212.
- Fischer, H. M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58:352-386.
- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L., and Hirsch, A. M. 2006. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:195-206.
- Gao, M., Coggin, A., Yagnik, K., and Teplitski, M. 2012. Role of specific quorum-sensing signals in the regulation of exopolysaccharide II production within *Sinorhizobium meliloti* spreading colonies. *PLoS One* 7:e42611.
- García-Rodríguez, F. M., and Toro, N. 2000. *Sinorhizobium meliloti nfe* (nodulation formation efficiency) genes exhibit temporal and spatial expression patterns similar to those of genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:583-591.
- Gibson, K. E., Barnett, M. J., Toman, C. J., Long, S. R., and Walker, G. C. 2007. The symbiosis regulator CbrA modulates a complex regulatory network affecting the flagellar apparatus and cell envelope proteins. *J. Bacteriol.* 189:3591-3602.
- Gregor, J., Zeller, T., Balzer, A., Habertzettl, K., and Klug, G. 2007. Bacterial regulatory networks include direct contact of response regulator proteins: Interaction of RegA and NtrX in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13:126-139.
- Ishida, M. L., Assumpção, M. C., Machado, H. B., Benelli, E. M., Souza, E. M., and Pedrosa, F. O. 2002. Identification and characterization of the two-component NtrY/NtrX regulatory system in *Azospirillum brasilense*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:651-661.
- Janczarek, M. 2011. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int. J. Mol. Sci.* 12: 7898-7933.
- Martínez-Abarca, F., Martínez-Rodríguez, L., López-Contreras, J. A., Jiménez-Zurdo, J. I., and Toro, N. 2013. Complete genome sequence of the alfalfa symbiont *Sinorhizobium/Ensifer meliloti* strain GR4. *Genome Announc.* 1:e00174-12.
- Mellor, H. Y., Glenn, A. R., Arwas, R., and Dilworth, M. J. 1987. Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifolii* TA1. *Arch. Microbiol.* 148:34-39.
- Miller, J. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Miller, L. D., Yost, C. K., Hynes, M. F., and Alexandre, G. 2007. The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is essential for competitive nodulation. *Mol. Microbiol.* 63:348-362.
- Miller-Williams, M., Loewen, P. C., and Oresnik, I. J. 2006. Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021. *Microbiology* 152:2049-2059.
- Morris, J., and González, J. E. 2009. The novel genes *emmABC* are associated with exopolysaccharide production, motility, stress adaptation, and symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 191:5890-5900.
- Nogales, J., Bernabéu-Roda, L., Cuéllar, V., and Soto, M. J. 2012. ExpR is not required for swarming but promotes sliding in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 194:2027-2035.
- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalik, H., Olivares, J., Lluch, C., and Sanjuan, J. 2002. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 225-232.
- Nogales, J., Domínguez-Ferreras, A., Amaya-Gómez, C. V., van Dillewijn, P., Cuéllar, V., Sanjuán, J., Olivares, J., and Soto, M. J. 2010. Transcriptome profiling of a *Sinorhizobium meliloti fadD* mutant reveals the role of rhizobactin 1021 biosynthesis and regulation genes in the control of swarming. *BMC Genomics* 11:157.
- Noonan, B., Motherway, M., and O'Gara, F. 1992. Ammonia regulation of the *Rhizobium meliloti* nitrogenase structural and regulatory genes under free-living conditions: Involvement of the *fixL* gene product? *Mol. Gen. Genet.* 234:423-428.
- Oldroyd, G. E., Murray, J. D., Poole, P. S., and Downie, J. A. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* 45:119-144.

- Olivares, J., Casadesús, J., and Bedmar, E. J. 1980. Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 39:967-970.
- Pawlowski, K., Klosse, U., and de Bruijn, F. J. 1991. Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two-component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 231:124-138.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- Robertsen, B. K., Åman, P., Darvill, A. G., McNeil, M., and Alberstein, P. 1981. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* 67:389-400.
- Rotter, C., Mühlbacher, S., Salamon, D., Schmitt, R., and Scharf, B. 2006. Rem, a new transcriptional activator of motility and chemotaxis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188:6932-6942.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73.
- Schlüter, J. P., Reinkensmeier, J., Barnett, M. J., Lang, C., Krol, E., Giegerich, R., Long, S. R., and Becker, A. 2013. Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic α -proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. *BMC Genomics* 14:156.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Nat. Biotechnol.* 1:784-791.
- Sourjik, V., Muschler, P., Scharf, B., and Schmitt, R. 2000. VisN and VisR are global regulators of chemotaxis, flagellar, and motility genes in *Sinorhizobium (Rhizobium) meliloti*. *J. Bacteriol.* 182:782-788.
- Spaank, H. P., Okker, R. J., Wijffelman, C. A., Pees, E., and Lugtenberg, B. J. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Mol. Biol.* 9:27-39.
- Torres, M. J., Hidalgo-García, A., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. 2013. Functional analysis of the copy 1 of the *fixNOQP* operon of *Ensifer meliloti* under free-living micro-oxic and symbiotic conditions. *J. Appl. Microbiol.* 114:1772-1781.
- Torres, M. J., Rubia, M. I., de la Peña, T. C., Pueyo, J. J., Bedmar, E. J., and Delgado, M. J. 2014. Genetic basis for denitrification in *Ensifer meliloti*. *BMC Microbiol.* 14:142-151.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., and Michiels, J. 2008. Living on a surface: Swarming and biofilm formation. *Trends Microbiol.* 16:496-506.
- Wang, C., Kemp, J., Da Fonseca, I. O., Equi, R. C., Sheng, X., Charles, T. C., and Sobral, B. W. 2010. *Sinorhizobium meliloti* 1021 loss-of-function deletion mutation in *chvI* and its phenotypic characteristics. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:153-160.
- Wang, D., Xue, H., Wang, Y., Yin, R., Xie, F., and Luo, L. 2013. The *Sinorhizobium meliloti ntrX* gene is involved in succinoglycan production, motility, and symbiotic nodulation on alfalfa. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:7150-7159.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
- Yao, S. Y., Luo, L., Har, K. J., Becker, A., Rüberg, S., Yu, G. Q., Zhu, J. B., and Cheng, H. P. 2004. *Sinorhizobium meliloti* ExoR and ExoS proteins regulate both succinoglycan and flagellum production. *J. Bacteriol.* 186:6042-6049.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCE

University of Bielefeld, Bielefeld, Germany:
<http://emma.cebitec.uni-bielefeld.de>

Proof Only

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos

Estación Experimental del Zaidín

