

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



**Identificación y estudio de genes simbióticos de
Sinorhizobium fredii HH103 previamente no
caracterizados**

Pilar Navarro Gómez

Sevilla, 2020

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



**Identificación y estudio de genes simbióticos de
Sinorhizobium fredii HH103 previamente no
caracterizados**

**Memoria presentada por la graduada en Biología Pilar Navarro
Gómez para optar al grado de Doctor**

Sevilla, 2020

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo. Dr. José María Vinardell González y Dr. Sebastián Acosta Jurado

Departamento de Microbiología

Universidad de Sevilla

Fdo. Pilar Navarro Gómez



*Mi agradecimiento al Plan Propio de la Universidad de Sevilla por haber
hecho posible la realización de este trabajo*

*Un invencible no es aquel que siempre gana, sino el que
nunca se rinde.*

Antonio Martín

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento a la Universidad de Sevilla por permitirme realizar esta Tesis doctoral. Agradecer a todas las personas que me han ayudado a realizar esta Tesis, dentro y fuera del departamento, muy especialmente a mis directores de Tesis J. María Vinardell y Sebastián Acosta. A mi familia. A Pablo.

ÍNDICES

ÍNDICE GENERAL

I. Índice de Figuras

II. Índice de Tablas

III. Abreviaturas

	Pág.
Resumen	
Resumen	1
Abstract	4
Introducción	
1. Impacto global de la fijación biológica del nitrógeno	9
2. Los rizobios	10
3. <i>Sinorhizobium fredii</i>	11
4. Interacción rizobio-leguminosa	12
5. Factores Nod	16
6. Reguladores transcripcionales implicados en simbiosis	17
6.1. NodD	18
6.2. NodR	20
6.3. SyrM	20
7. Polisacáridos superficiales	21
7.1. Polisacárido capsular de tipo antígeno K (KPS)	22
7.2. Exopolisacárido (EPS)	23
7.3. Glucanos cíclicos (GC)	23
7.4. Lipopolisacárido (LPS)	24
8. Hopanoides	25
9. Sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas	27

9.1. El sistema de secreción de tipo 3 (T3SS)	29
10. Movilidad	30
10.1. El flagelo	32
Objetivos	39
Objetivos	41
Materiales y métodos	43
1. Materiales y métodos relacionados con bacterias	45
1.1. Bacterias, plásmidos y agentes selectivos e identificativos	45
1.1.1. Bacterias y plásmidos	45
1.1.2. Agentes selectivos e identificativos	52
1.1.3. Flavonoides	52
1.2. Medios de cultivo	53
1.2.1. Medios de cultivo para <i>Sinorhizobium</i>	53
1.2.2. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	54
1.2.3. Solución de conservación de bacterias	55
1.3. Medidas de pH y espectrometría	55
1.4. Estudio de los polisacáridos superficiales de la bacteria <i>S. fredii</i> HH103	55
1.4.1. Estudio del lipopolisacárido (LPS)	55
1.4.2. Estudio del polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS)	57
1.4.3. Estudio del exopolisacárido (EPS)	59
1.5. Curvas de crecimiento	60
1.6. Ensayos de formación de biopelícula (<i>biofilm</i>)	60
1.7. Ensayos de movilidad	61
1.7.1. Ensayos de movilidad en superficie	61
1.7.2. Ensayos de movilidad de tipo <i>swimming</i>	62

1.7.3. Microscopía electrónica de transmisión	62
1.8. Métodos relacionados con ácidos nucleicos	62
1.8.1. Métodos de transferencia de ADN	62
1.8.1.1. Conjugación bacteriana triparental	62
1.8.1.2. Transformación de <i>E. coli</i>	63
1.8.2. Extracción del ADN genómico	64
1.8.3. Extracción del ADN plasmídico (minipreps)	65
1.8.4. Restricción del ADN	65
1.8.5. Electroforesis del ADN	65
1.8.6. Aislamiento del ADN de geles de agarosa	66
1.8.7. Desfosforilación del ADN	66
1.8.8. Ligación del ADN	66
1.8.9. Amplificación del ADN por PCR	66
1.8.10. RT-PCR	68
1.8.11. Mutagénesis <i>in vitro</i> por delección mediante PCR solapante	69
1.8.12. Transferencia por conjugación de derivados del plásmido pK18 <i>mobsacB</i>	71
1.8.13. Hibridación ADN::ADN	72
1.8.13.1. Transferencia del ADN a filtros de nylon	72
1.8.13.2. Marcaje de la sonda	72
1.8.13.3. Hibridación de la sonda al ADN del filtro	73
1.8.13.4. Detección inmunológica	73
1.8.14. Secuenciación del ADN	74
1.8.15. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas	74
1.8.16. Análisis informático de estructura de proteínas	74
1.8.17. Análisis estadístico	75
1.8.18. Visualización de las nubes de transcritos	75

1.8.19. Ensayos de doble híbrido	75
1.8.20. Cuantificación de la expresión de genes bacterianos	78
1.8.20.1. PCR cuantitativa (<i>qPCR</i>)	78
1.8.20.2. Medida de la actividad β -galactosidasa	81
1.8.20.3. RNA- <i>Seq</i>	81
2. Materiales y métodos utilizados para los estudios con plantas	82
2.1. Plantas	82
2.2. Soluciones nutritivas para las plantas	83
2.3. Desinfección y germinación de semillas	83
2.4. Inoculación y cultivo de plantas	84
2.4.1. Jarro de Leonard (Vincent, 1970)	84
2.4.2. Sistema de hidroponía en vaso de precipitado	84
2.5. Ensayos de nodulación	85
2.5.1. Recuento del número de nódulos y estimación de su peso	85
2.5.2. Estimación de la actividad nitrogenasa	85
2.5.3. Secado de la parte aérea de la planta	85
2.6. Ensayos de adhesión-colonización en plantas de soja	86
2.7. Microscopía óptica	86
Resultados y discusión	87
Capítulo 1. Estudio de la relevancia simbiótica de genes pertenecientes al regulón <i>nod</i> de <i>S. fredii</i> HH103 previamente no caracterizados: psfHH103d_208 y psfHH103d_448	89
1. Introducción	89
2. Resultados	89
2.1. Caracterización <i>in silico</i> de los genes psfHH103d_208 y psfHH103d_448 de <i>S. fredii</i> HH103	89

2.2. Obtención de mutantes en los genes psfHH103d_208 y psfHH103d_448 de <i>S. fredii</i> HH103	93
---	----

2.3. Fenotipo simbiótico de los mutantes en los genes psfHH103d_208 y psfHH103d_448 de <i>S. fredii</i> HH103 en soja	94
---	----

3. Discusión	96
--------------	----

Capítulo 2. Caracterización simbiótica de genes relacionados con la producción de hopanoides

1. Introducción	99
-----------------	----

2. Resultados	99
---------------	----

2.1. Estudios <i>in silico</i> de los genes psfHH103d_373, psfHH103d_372, psfHH103d_371.5, psfHH103d_371 y psfHH103d_370 de <i>S. fredii</i> HH103	99
--	----

2.2. Obtención de mutantes en los genes psfHH103d_370, psfHH103d_373 y psfHH103d_371.5 de <i>S. fredii</i> HH103	103
--	-----

2.3. Estudio del KPS y del LPS	103
--------------------------------	-----

2.4. Fenotipo simbiótico de los mutantes d_370, d_373 y d_371.5 de <i>S. fredii</i> HH103 en <i>Glycine max</i> cultivar Williams, <i>Glycyrrhiza uralensis</i> y <i>Lotus burttii</i>	104
--	-----

3. Discusión	107
--------------	-----

Capítulo 3. Caracterización del grupo de genes SFHH103_00346 (*flgJ*)-00347-00348

1. Introducción	113
-----------------	-----

2. Resultados	113
---------------	-----

2.1. Análisis <i>in silico</i> de la región SFHH103_00346-SFHH103_00348	113
---	-----

2.2. Obtención de mutantes en los genes <i>flgJ</i> , 00347 y 00348	115
---	-----

2.3. Análisis de la funcionalidad de las cajas SyrM (SB) y <i>tts</i> (TB) en presencia de genisteína	116
---	-----

2.4. ¿Forman <i>flgJ</i> , 00347 y 00348 un operón?	118
---	-----

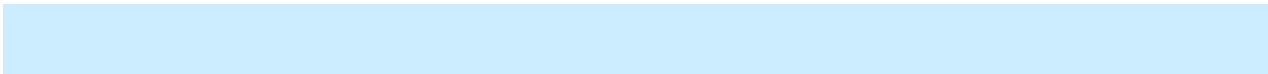
2.5. Efecto de la mutación en los genes <i>flgJ</i> , 00347 y 00348 sobre la producción de EPS	120
--	-----

2.6. Estudio del LPS y KPS	124
----------------------------	-----

2.7. Movilidad	125
----------------	-----

2.8. Fenotipo simbiótico de los mutantes <i>flgJ::lacZ</i> , $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$ de <i>S. fredii</i> HH103 en <i>Glycine max</i> cultivar Williams, <i>Vigna unguiculata</i> cv. Bisbee Red (caupí) y <i>Lotus burtii</i>	132
2.9. Doble híbrido	137
3. Discusión	138
Capítulo 4. Estudio de la red reguladora influenciada por flavonoides de <i>S. fredii</i> HH103	151
1. Introducción	151
2. Resultados	152
2.1. Análisis transcriptómico en los mutantes <i>nodD2</i> , <i>syrM</i> y <i>nolR</i> de los genes diferencialmente expresados de <i>S. fredii</i> HH103 en presencia de genisteína	152
2.2. Análisis transcriptómico de los principales genes reguladores del regulon <i>nod</i> en presencia de genisteína y validación de los datos obtenidos por RNAseq mediante experimentos de qPCR	168
2.3. Experimentos de doble híbrido de NodD1 y NodD2	172
2.4. Los mutantes de <i>S. fredii</i> HH103 en <i>nodD2</i> y <i>nolR</i> no nodulan <i>L. japonicus</i> Gifu cuando se inactiva <i>nodA</i>	173
3. Discusión	174
Conclusiones	189
Conclusiones	191
Conclusions	193
Bibliografía	195
Bibliografía	197
Anexos	227
Anexo I. Material Suplementario. Obtención de los mutantes.	229
Anexo II. Publicaciones	231

1. Publicaciones relacionadas con esta Tesis	231
2. Otras publicaciones no relacionadas con esta Tesis	237



I. ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Proceso de nodulación a través de las vías dependiente e independiente de los NFs	15
Figura 2. Estructura de los NFs y sus decoraciones descritas	17
Figura 3. Disposición de los polisacáridos superficiales en la superficie rizobiana	22
Figura 4. Comparación estructural entre el colesterol y diversos hopanoides	26
Figura 5. Sistemas de secreción de bacterias Gram-negativas	28
Figura 6. Representación esquemática del flagelo bacteriano y el T3SS	29
Figura 7. Principales tipos de moviidades bacterianas	31
Figura 8. Estructura del flagelo de una bacteria Gram-negativa	33
Figura 9. Componentes del flagelo de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	37
Figura 10. Esquema de la mutagénesis <i>in vitro</i> por delección mediante PCR solapante	70
Figura 11. Principio del sistema de doble híbrido en bacterias.	76
Figura 12. Metodología para analizar la interacción proteína-proteína con el sistema BACTH	78
Figura 13. Representación de los dominios conservados de d_208 y esquema del mecanismo de funcionamiento de un transportador tipo ABC	90
Figura 14. Alineamiento de d_448 con la proteína PhoB de otros rizobios	92
Figura 15. Fenotipo simbiótico de <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados SVQ776 y SVQ777 con soja	95
Figura 16. Microscopía óptica de nódulos inducidos en <i>G. max</i> cv. Williams por <i>S. fredii</i> HH103 y SVQ777	96
Figura 17. Representación de los dominios conservados de d_373	100
Figura 18. Proceso de biosíntesis de hopanoides y organización génica de los genes d_373 a d_370 en diferentes rizobios	102
Figura 19. Geles de LPS y KPS de <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados d_370, d_371.5 y d_373	103

Figura 20. Fenotipo simbiótico de <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados d_370, d_371.5 y d_373 en soja	106
Figura 21. Cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas de lípidos extraídos de <i>S. fredii</i> HH103 y <i>B. japonicum</i> crecidos en presencia de genisteína	110
Figura 22. Nube de transcritos de la región génica psfHH103d_373 a 370 de <i>S. fredii</i> HH103 en presencia y ausencia de genisteína	112
Figura 23. Representación de la región génica cromosómica de los genes <i>flgJ</i> , 00347 y 00348	113
Figura 24. Comparación de la secuencia consenso nucleotídica de las TB de <i>S. fredii</i> HH103 con la TB imperfecta de <i>flgJ</i>	117
Figura 25. Ensayos de actividad β -galactosidasa de los plásmidos pMUS1392 (TB) y pMUS1393 (SB+TB) en el fondo silvestre <i>S. fredii</i> HH103 y en diferentes fondos mutantes	118
Figura 26. Nube de transcritos de la región génica SFHH103_00346-00348 de <i>S. fredii</i> HH103 en presencia y ausencia de genisteína	119
Figura 27. Análisis de cotranscripción por RT-PCR del grupo génico <i>flgJ</i> -00347-00348	120
Figura 28. Mucosidad de <i>S. fredii</i> HH103 y los mutantes en los genes <i>flgJ</i> , 00347 y 00348 en medio YMA y TY en presencia y ausencia de genisteína	121
Figura 29. Equivalentes de glucosa en el medio extracelular de <i>S. fredii</i> HH103 y los mutantes <i>flgJ</i> , 00347 y 00348 en presencia y ausencia de genisteína	122
Figura 30. Capacidad de formación de <i>biofilm</i> de <i>S. fredii</i> HH103 y los mutantes <i>flgJ</i> , 00347 y 00348 crecidos en presencia o ausencia de genisteína	123
Figura 31. Capacidad formadora de <i>biofilm</i> de <i>S. fredii</i> HH103 y los mutantes <i>flgJ::lacZ</i> , $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$ portando el plásmido pSKDsRED sobre portacristales	124
Figura 32. Geles de LPS y KPS de <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>flgJ::lacZ</i> , $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$	125
Figura 33. Curva de crecimiento de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R y sus derivados <i>flgJ::lacZ</i> y $\Delta flgJ$ en medio mínimo	126
Figura 34. Curva de crecimiento de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R y sus derivados $\Delta 347$ y $\Delta 348$ en medio mínimo	126
Figura 35. Curva de crecimiento de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R y sus derivados <i>flgJ::lacZ</i> y $\Delta flgJ$ en medio Bromfield	126

Figura 36. Curva de crecimiento de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R y sus derivados Δ 347 y Δ 348 en medio Bromfield	127
Figura 37. Representación gráfica de la movilidad tipo <i>swimming</i> y ensayos de movilidad tipo <i>swimming</i> en medio Bromfield (0,3 % agar) de <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>flgJ::lacZ</i> , Δ <i>flgJ</i> , Δ 347, Δ 348, Δ 347C y Δ 348C	127
Figura 38. Imágenes del microscopio electrónico de transmisión que muestran la producción del flagelo en la estirpe <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R y sus mutantes <i>flgJ::lacZ</i> , Δ <i>flgJ</i> , Δ 347 y Δ 348	130
Figura 39. Representación gráfica de la movilidad en superficie y ensayos de movilidad en superficie en medio mínimo (0,4 % agarosa) de <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>flgJ::lacZ</i> , Δ <i>flgJ</i> , Δ 347, Δ 348, Δ 347C y Δ 348C	131
Figura 40. Fenotipo simbiótico de <i>S. fredii</i> HH103 Rif ^R y sus mutantes <i>flgJ::lacZ</i> , Δ <i>flgJ</i> , Δ 347, Δ 348, Δ 347C y Δ 348C en soja	136
Figura 41. Ensayo de doble híbrido de FlgJ, 347 y 348	138
Figura 42. Mapa de transcritos en presencia de genisteína donde se indica la localización de la TB y SB con respecto al punto de inicio de la traducción de <i>flgJ</i>	140
Figura 43. Comparación de la secuencia consenso nucleotídica de las TB de <i>S. fredii</i> HH103 con la TB localizada aguas arriba de 00347	142
Figura 44. Estructura de los productos de los genes 00347 y 00348	144
Figura 45. Ensayo de doble híbrido de NodD1 y NodD2	173
Figura 46. Ensayos de actividad β -galactosidasa de los genes <i>nodD1</i> , <i>nolR</i> y <i>nodD2</i> en diferentes fondos reguladores mutantes en ausencia y presencia de genisteína	182
Figura 47. Ensayos de actividad β -galactosidasa para el estudio de la sobreexpresión de los diversos reguladores en cada fondo regulador:: <i>lacZ</i> , en ausencia y presencia de genisteína	184
Figura 48. Esquema de modulación de la expresión del regulón <i>nod</i> mediada por los principales reguladores en <i>S. fredii</i> HH103	185

II. ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Información obtenida en la secuenciación del genoma de <i>S. fredii</i> HH103	12
Tabla 2. Bacterias y plásmidos utilizados en esta Tesis	45
Tabla 3. Cebadores utilizados en esta tesis para amplificar fragmentos de ADN para clonación	67
Tabla 4. Cebadores utilizados en esta Tesis en experimentos de RT-PCR	69
Tabla 5. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para la mutagénesis <i>in vitro</i> por delección mediante PCR solapante	71
Tabla 6. Cebadores empleados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para los ensayos de doble híbrido	76
Tabla 7. Cebadores utilizados en esta Tesis para ensayos de <i>q</i> PCR de genes de <i>S. fredii</i> HH103	80
Tabla 8. Plantas utilizadas en esta Tesis	83
Tabla 9. Respuesta de <i>G. max</i> cv. Williams a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados SVQ776 y SVQ777	94
Tabla 10. Presencia y porcentaje de identidad de las proteínas d_373 a d_370 de <i>S. fredii</i> HH103 en otros rizobios	101
Tabla 11. Respuesta de <i>G. uralensis</i> a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados d_370, d_373 y d_371.5	104
Tabla 12. Respuesta de <i>L. burtii</i> a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados d_370, d_373 y d_371.5	105
Tabla 13. Respuesta de <i>G. max</i> cv. Williams a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados d_370, d_373 y d_371.5	105
Tabla 14. Lecturas de los genes d_373 a d_370 de <i>S. fredii</i> HH103 en presencia y ausencia de genisteína obtenidas por RNAseq	111
Tabla 15. Respuesta de <i>V. unguiculata</i> cv. Bisbee Red (caupí) a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>flgJ::lacZ</i> , Δ <i>flgJ</i> , Δ 347 y Δ 348	133
Tabla 16. Respuesta de <i>L. burtii</i> a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>flgJ::lacZ</i> , Δ <i>flgJ</i> , Δ 347 y Δ 348	134

Tabla 17. Respuesta de <i>G. max</i> cv. Williams a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>flgJ::lacZ</i> , $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$	135
Tabla 18. Datos de RNAseq sobre los niveles de expresión de <i>flgJ</i> , 00347 y 00348 en diferentes fondos mutantes en presencia de genisteína	141
Tabla 19. Datos de RNAseq sobre los niveles de expresión de <i>flgJ</i> , 00347 y 00348 en los fondos mutantes NoIR y NodD2 en presencia de exudados radicales de <i>L. japonicus</i>	141
Tabla 20. Porcentaje de colonización de las raíces de soja a las 72 horas de inoculación con la estirpe parental y los mutantes <i>flgJ::lacZ</i> , $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$	147
Tabla 21. Lecturas de los genes <i>flgJ</i> , 00347 y 00348 en presencia y ausencia de genisteína	150
Tabla 22. ORFs de <i>S. fredii</i> HH103 reguladas por genisteína a través de una NB	153
Tabla 23. Niveles de expresión de DEGs regulados por NB en <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>nolR</i> , <i>nodD2</i> y <i>syrM</i> en presencia de genisteína	156
Tabla 24. ORFs de <i>S. fredii</i> HH103 reguladas por genisteína a través de una TB	158
Tabla 25. Niveles de expresión de DEGs en diferentes estirpes de <i>S. fredii</i> HH103 dependientes de genisteína y TB	160
Tabla 26. Niveles de expresión de DEGs en diferentes estirpes de <i>S. fredii</i> HH103 dependientes de genisteína y SB	163
Tabla 27. Niveles de expresión de DEGs en diferentes estirpes de <i>S. fredii</i> HH103 dependientes de genisteína y que carecen de NB, TB o SB	165
Tabla 28. DEGs en diferentes estirpes de <i>S. fredii</i> HH103 cuyos niveles de expresión se afecta notablemente por genisteína incluso en ausencia de los reguladores NodD1 y/o TtsI	166
Tabla 29. Validación de los datos de RNAseq usando qRT-PCR (qPCR)	167
Tabla 30. Niveles de expresión (RNAseq) de <i>nodD1</i> , <i>ttsI</i> , <i>nolR</i> , <i>nodD2</i> y <i>syrM</i> en la estirpe silvestre y en los distintos fondos mutantes en genes reguladores en presencia y ausencia de genisteína comparado con la estirpe silvestre en ausencia de este flavonoide	169
Tabla 31. Correlación entre los experimentos de RNAseq y qPCR para los genes reguladores del regulón <i>nod</i>	171
Tabla 32. Respuesta de <i>L. japonicus</i> a la inoculación con <i>S. fredii</i> HH103 y sus derivados <i>nodD2</i> , <i>nolR</i> , <i>nodA</i> <i>nodD2</i> y <i>nodA</i> <i>nolR</i>	174

III. ABREVIATURAS

ARA, ensayo de reducción de acetileno (del inglés *Acetylene Reduction Assay*)

BHT, bacteriohopanetetrol

DEG, genes diferencialmente expresados (del inglés, *Differentially Expressed Genes*)

Dpi, días después de la inoculación (del inglés *Days Post Inoculation*)

EPS, exopolisacárido

FBN, Fijación Biológica de Nitrógeno

GC, glucano cíclico

Kb, kilobase

KDa, KiloDalton

Kdo, ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico

Kdx, derivado del Kdo

KPS, polisacárido capsular de tipo antígeno-K

LPS, lipopolisacárido

LCO, lipo-quito-oligosacárido

ME, membrana externa

MI, membrana interna

GlcNAc, N-acetil-D-glucosamina (del inglés *N-Acetylglucosamine*)

MurNAc, N-acetilmurámico (del inglés *N-Acetylmuramic acid*)

NB, caja *nod* (del inglés *nod box*)

NF, factor de nodulación (del inglés *Nod Factor*)

NolRB, caja *nolR*

Nops, efectores (del inglés *Nodulation Outer Proteins*)

ORFs, marcos de lectura abiertos (del inglés *Open Read Frames*)

PAGE, del inglés *PolyAcrilamide Gel Experiments*

Pb, pares de bases

PG, peptidoglicano

PSPA, peso seco de la parte aérea.

rhc, genes estructurales del T3SS de los rizobios (del inglés *rhizobium conserved*)

SB, caja *SyrM* (del inglés *SyrM box*)

SHCs, hopano-escualeno ciclasas (del inglés *Squalene-Hopene Cyclases*)

T1-9SS, sistema de secreción de tipo 1-9 (del inglés, *Type 1-9 Secretion System*)

TB, caja *tts* (del inglés *tts box*)

RESUMEN

Resumen

En la relación simbiótica que tiene lugar entre plantas leguminosas y rizobios fijadores de nitrógeno es necesaria una comunicación recíproca entre ambos organismos en la que intervienen señales químicas producidas por la planta y la bacteria. *Sinorhizobium fredii* HH103 es un rizobio simbiote de la soja que presenta un amplio rango de hospedador (Margaret *et al.*, 2011; Vinardell *et al.*, 2015). Los flavonoides exudados por la raíz de la leguminosa inducen la expresión de los genes simbióticos rizobianos a través de la activación de la proteína bacteriana NodD. La proteína reguladora NodD se expresa constitutivamente y codifica un activador transcripcional de tipo LysR que, en presencia de flavonoides específicos, reconoce y se une a *nod boxes* (NB), secuencias promotoras localizadas aguas arriba de los genes de nodulación, desencadenando su transcripción. Las NB controlan la expresión de genes involucrados en la producción de señales moleculares (factores Nod) necesarias para los pasos iniciales de la interacción simbiótica, así como para la transcripción del gen *ttsI*, cuyo producto va a reconocer y unirse a *tts boxes* (TB), induciendo la secreción de proteínas (efectores) a través del sistema de secreción de tipo 3 (T3SS). Estas proteínas efectoras modulan la respuesta defensiva de la planta y son importantes para determinar la compatibilidad entre ambos simbioses. También hay varios genes de HH103 con función desconocida y cuya expresión es dependiente de NB. Además, hay grupos de genes en HH103 que se expresan diferencialmente en presencia de genisteína (flavonoide inductor de los genes de nodulación en HH103) pero que no están controlados por una NB o una TB (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b).

Actualmente, muchos de estos genes de *S. fredii* HH103 ya han sido estudiados. Sin embargo, todavía hay genes simbióticos importantes que continúan sin ser caracterizados. El estudio de algunos de estos genes ha sido uno de los objetivos principales de esta Tesis para profundizar en su posible papel simbiótico y aumentar el conocimiento sobre los determinantes moleculares que permiten que esta bacteria establezca simbiosis con un elevado número de leguminosas. Más específicamente, hemos estudiado los siguientes genes:

- psfHH103d_448 y psfHH103d_208 cuya expresión es controlada por la NB13 y 17, respectivamente (objetivo 1). El gen psfHH103d_448 codifica una proteína hipotética no presente en otros rizobios, incluso en otras estirpes de *S. fredii*. Contiene un dominio receptor, lo que sugiere su pertenencia a un sistema de dos componentes, en el que

participan una proteína histidina quinasa (HK) y una proteína reguladora de respuesta (RR). La HK, regulada por un estímulo ambiental, se autofosforila en un residuo de histidina creando un grupo fosforilo altamente energético que es transferido a un residuo de aspartato en la RR. La fosforilación de esta proteína induce un cambio conformacional en su dominio regulador lo que resulta en la activación de su dominio efector desencadenando así una respuesta (Stock *et al.*, 2000). El producto de psfHH103d_448 podría ser el componente RR, pero carece de dominio conocido de unión a ADN. El gen psfHH103d_208 codifica una proteína con un dominio conservado denominado casete de unión a ATP, lo que indica que es miembro de la familia de transportadores de tipo ABC (del inglés, *ATP-binding cassette*). Esta familia de transportadores comprende una superfamilia grande y diversa de transportadores de membrana que están presentes en todos los dominios de la vida. En bacterias, catalizan reacciones de transporte. Por ejemplo, la absorción de micronutrientes de alta afinidad y la exportación de compuestos citotóxicos (contribuyendo a la resistencia de la bacteria a medicamentos) (Locher, 2016). En esta Tesis hemos visto que la inactivación de cualquiera de estos dos genes no tiene efecto en la eficiencia simbiótica de HH103 con soja.

- Cinco genes localizados en el plásmido simbiótico y regulados por la NB1 (objetivo 2). Esta caja controla la expresión de psfHH103d_373 a psfHH103d_370, los cuales podrían estar implicados en síntesis de triterpenoides pentacíclicos llamados hopanoides. La inactivación de sus genes ortólogos en *Bradyrhizobium sp.* y *Bradyrhizobium diazoefficiens* afecta negativamente a la supervivencia bacteriana en condiciones de estrés y a su capacidad simbiótica con sus leguminosas hospedadoras. El hecho de que en *S. fredii* HH103 estos genes se induzcan por flavonoides y NodD1 sugirió que los hopanoides podrían ejercer un papel protector durante la simbiosis. Sin embargo, en esta Tesis hemos visto que HH103 no produce hopanoides en presencia de flavonoides y que la inactivación de varios de estos genes tiene poco efecto en la simbiosis con soja.

- Un posible operón localizado en el cromosoma y constituido por *flgJ* (codifica una proteína flagelar) y dos genes que codifican proteínas hipotéticas conservadas, SFHH103_00347 y SFHH103_00348 (objetivo 3). En esta Tesis hemos visto que la expresión de estos genes es dependiente de NodD1 y TtsI a través de una TB imperfecta localizada aguas arriba de *flgJ*, pero que su expresión también se ve ligeramente influenciada por SyrM debido a la presencia de una SyrM *box* (SB) también imperfecta. La inactivación de cualquiera de estos genes suprime totalmente la movilidad de tipo *swimming*, y en el caso de SFHH103_00347 y SFHH103_00348, también la movilidad

en superficie, la cual es dependiente de genisteína en HH103. Los mutantes en *flgJ* y en SFHH103_00347 carecen de flagelo. La inactivación de *flgJ* disminuye parcialmente la movilidad en superficie indicando que, además del *swarming*, otros mecanismos son responsables de este tipo de movilidad. En simbiosis, la inactivación de estos genes tiene distintos efectos en función del gen mutado y de la leguminosa hospedadora estudiada.

Finalmente, en trabajos previos, nuestro grupo mostró que la proteína NodD1 es el regulador principal en presencia de genisteína de la expresión génica de HH103, pero otros genes reguladores tienen un papel en la modulación de la expresión del regulón *nod*. El segundo objetivo principal de esta Tesis (objetivo 4) ha sido continuar con la caracterización del complejo circuito regulador que depende de flavonoides en *S. fredii* HH103. Para este propósito, hemos integrado los datos de RNAseq de mutantes de HH103 afectados en diferentes reguladores transcripcionales, y hemos usado métodos alternativos (*q*PCR, ensayos β -galactosidasa) para analizar la expresión de esos reguladores en distintas condiciones (presencia o ausencia de flavonoides, presencia o ausencia de otros reguladores). Hemos visto la importancia de los reguladores transcripcionales TtsI, NodD2, NolR y SyrM como “elementos secundarios” del regulón *nod*, conduciendo a un *fine tuning* de diferentes características bacterianas involucradas en la transición de vida libre al estado simbiótico: factores Nod y producción de exopolisacáridos, liberación de proteínas efectoras a través del T3SS simbiótico, movilidad en superficie.

Abstract

The symbiotic relationship between legumes and nitrogen-fixing rhizobia involves reciprocal communication by means of chemical signals produced by the plant and the bacterium. *Sinorhizobium fredii* HH103 is a rhizobial soybean symbiont that exhibits an extremely broad host range (Margaret *et al.*, 2011; Vinardell *et al.*, 2015). Flavonoids exuded by legume roots induce the expression of rhizobial symbiotic genes through activation of the bacterial protein NodD. The regulatory protein NodD is constitutively expressed and codes for a LysR-type transcriptional activator that, in the presence of specific flavonoids, recognizes and binds to *nod boxes* (NB), promoter sequences located upstream of nodulation genes, triggering their transcription. NB drive the expression of genes involved in the production of molecular signals (Nod factors) required for the initial steps of the symbiotic interaction but also the transcription of *ttsI*, whose encoded product binds to *tts boxes* (TB), inducing the secretion of proteins (effectors) through the type 3 secretion system (T3SS). These effector proteins modulate plant defence responses and are important for the determination of compatibility between both symbionts. There are also various HH103 genes of unknown function and whose expression is dependent on NB. In addition, there is a set of HH103 genes that are differentially expressed in the presence of the inducer flavonoid genistein but lack a NB or TB promoter regions (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b).

Nowadays, many of these *S. fredii* HH103 genes has been studied. However, there are genes of symbiotic relevance still uncharacterized. The study of some of these *S. fredii* HH103 genes has been one of the main objectives of this Thesis in order to elucidate their putative symbiotic role and increase our knowledge about the molecular determinants that allow this bacterium to establish symbiosis with a high number of legumes. More specifically, we have started the study of the following genes:

- psfHH103d_448 and psfHH103d_208, whose expression is driven by NB13 and 17, respectively (objective 1). psfHH103d_448 codes for a hypothetical protein not present in other rhizobia, not even in others *S. fredii* strains. It contains a receiver domain (REC) suggesting that it is part of a Two-Component System, involving a histidine protein kinase and a response regulator protein. The histidine protein kinase, which is regulated by environmental stimuli, autophosphorylates at a histidine residue, creating a high-energy phosphoryl group that is subsequently transferred to an aspartate residue in the response regulator protein. Phosphorylation induces a conformational change in the regulatory

domain that results in the activation of an associated domain involved in gene regulation (Stock *et al.*, 2000). Although the presence of a REC domain suggests that the psfHH103d_448 product might be a response protein, it lacks a known DNA-binding domain. psfHH103d_208 codes for a protein containing a conserved domain termed ATP-binding cassette, which indicates that it is a member of the ABC transporters family. ABC transporters comprise a large, diverse, and ubiquitous superfamily of membrane active transporters that are found in all domains of life. In bacteria, they catalyse transport reactions, such as the high-affinity uptake of micronutrients into bacteria and the export of cytotoxic compounds contributing to drug resistance (Locher, 2016). In this Thesis we showed that inactivation of any of these two genes has not an effect on the symbiotic effectiveness of HH103 with soybean.

- Five genes located on the pSym and induced through NB1 (objective 2). This NB controls the expression of psfHH103d_373 to psfHH103d_370, which might be related to the synthesis of pentacyclic triterpenoids called hopanoids. Inactivation of the orthologous genes of *Bradyrhizobium sp.* and *Bradyrhizobium diazoefficiens* negatively affects bacterial survival in stressful conditions and symbiotic performance with their host legumes. The fact that in *S. fredii* HH103 hopanoid-related genes are induced by flavonoids in a NodD1 dependent manner suggested that hopanoids could have a bacterial protective role during symbiosis (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). However, in this Thesis we showed that HH103 does not produce hopanoids in the presence of flavonoids and that the inactivation of several of these genes has small effect on symbiosis with soybean.

- A putative operon located on the chromosome that is composed of *flgJ* (coding for a flagellar protein) and two genes coding for conserved hypothetical proteins, SFHH103_00347 and SFHH103_00348 (objective 3). In this Thesis we showed that expression of these genes is dependent on NodD1 and TtsI through an imperfect TB located upstream of *flgJ*, but also slightly influenced by SyrM because the presence of an imperfect SyrM box. Inactivation of any of these genes fully impaired swimming motility, and that of SFHH103_00347 and SFHH103_00348, also surface motility, which in HH103 is dependent on the presence of genistein. Mutants in either *flgJ* or SFHH103_00347 lack flagella. Inactivation of *flgJ* decreases only partially surface motility, indicating that, in addition to swarming, other mechanisms are responsible for that kind of motility. In symbiosis, inactivation of these genes have different effects depending on the mutated gene and the host legume analysed.

In previous works, our group has showed that NodD1 accounts for most of the regulatory effect of genistein, an inducing flavonoid, on HH103 gene expression, but that other regulatory genes can have a role on modulating the expression of the *nod* regulon. The second main objective of this Thesis (objective 4) has been the continuation of the characterization of the complex genetic regulatory circuit that depends on flavonoids in *S. fredii* HH103. For that purpose, we have integrated the RNAseq data of HH103 mutants affected in different transcriptional regulators, and used alternative methods (*q*PCR, β -galactosidase assays) to analyse the expression of those regulators in different conditions (presence or absence of flavonoids, presence or absence of other regulators) We showed the importance of the transcriptional regulators TtsI, NodD2, NolR and SyrM as “secondary” actors of the *nod* regulon, leading to a fine tuning modulation of different bacterial traits involved in the transition of the free-living to the symbiotic state: Nod factors and exopolysaccharide production, delivering of effector proteins through a symbiotic T3SS, surface motility.

INTRODUCCIÓN

1. Impacto global de la fijación biológica del nitrógeno.

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es una forma de fertilización natural que consiste en la reducción del nitrógeno atmosférico hasta amonio, una forma asimilable por las plantas, realizada en parte a través de las relaciones simbióticas que se establecen entre plantas de la familia de las leguminosas y determinados microorganismos denominados rizobios (Poole *et al.*, 2018).

La agricultura moderna utiliza plantas con altos potenciales productivos, entre las que destacan las leguminosas. Los cultivos de leguminosas tienen gran relevancia económica porque son consumidos por millones de personas en todo el mundo y, además, tienen excelentes propiedades nutricionales. Las semillas de estas plantas proporcionan proteínas (el doble o triple que la mayoría de cereales), fibras dietéticas y carbohidratos, así como ácidos grasos, ácido fólico, vitaminas y minerales, los cuales son beneficiosos para la salud humana (Jacob *et al.*, 2016). En el año 2016, la superficie cultivada con leguminosas a nivel mundial era de 170 millones de hectáreas con una producción de 336 millones de toneladas de leguminosas de grano (FAO FAOSTAT; González-Bernal y Rubiales, 2016). Los cultivos agrícolas demandan un elevado aporte de productos nitrogenados que puede ser muy superior a la cantidad de nitrógeno asimilable del suelo, por lo que el nitrógeno se convierte en uno de los factores limitantes para el crecimiento vegetativo y uno de los elementos claves en la producción agrícola. Por lo tanto, en la mayoría de los cultivos es necesario aportar fertilizantes nitrogenados, lo que aumenta considerablemente los costes de producción. La fijación biológica del nitrógeno puede resolver en parte este problema ya que el incremento de su aplicación puede disminuir la necesidad del uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos y presenta grandes beneficios sobre el ciclo del nitrógeno, el calentamiento global y el saneamiento de las aguas subterráneas y superficiales. De hecho, actualmente juega un papel muy importante en la productividad agrícola mundial, convirtiendo anualmente alrededor de 170 millones de toneladas de nitrógeno atmosférico en amonio (Freiberg *et al.*, 1997) y ahorrando así más de 6.800 millones de dólares en fertilizantes nitrogenados (Herridge y Rose, 2000; Adams *et al.*, 2018).

Dentro de la FBN, presenta especial importancia la que tiene lugar en la relación simbiótica que tiene lugar entre rizobios y leguminosas (Poole *et al.*, 2018). Esta interacción no sólo es importante por su relevancia ecológica y agronómica, sino también porque es un modelo de estudio de interacción bacteria-eucariota con características

similares a las relaciones establecidas entre bacterias patógenas y hospedadores eucarióticos (plantas o animales).

2. Los rizobios.

Se denominan rizobios aquellas bacterias presentes en el suelo que se caracterizan por ser capaces de establecer simbiosis con plantas de la familia *Leguminosae* (Sawada *et al.*, 2003; Downie, 2010). En esta simbiosis, las raíces de la planta son infectadas por los rizobios, que se alojarán en nuevos órganos formados por la planta llamados nódulos, donde se diferenciarán a bacteroides capaces de fijar nitrógeno: este complejo proceso se denomina nodulación (Spaink *et al.*, 1998; Suzaki *et al.*, 2015). Los rizobios pertenecen principalmente a la clase α -proteobacteria (siendo el orden *Rhizobiales* el más amplio), aunque también existen algunos pertenecientes a la clase β -proteobacteria (Chen *et al.*, 2003; Gyaneshwar *et al.*, 2011; Madigan *et al.*, 2015).

Los rizobios son bacilos Gram-negativos, móviles mediante flagelos y que habitan en suelos localizándose mayoritariamente en la rizosfera (Sugiyama, 2019), ambiente que aporta generalmente protección frente a condiciones adversas tales como la desecación, la temperatura y el estrés lumínico. Fisiológicamente son quimiorganoheterótrofos, aerobios versátiles en cuanto al uso de fuentes de carbono, crecen bien en medios complejos, y presentan una temperatura óptima de crecimiento comprendida entre 25 y 30°C (Kahn *et al.*, 1998; Madigan *et al.*, 2004).

Durante el proceso simbiótico, la planta suministra ácidos orgánicos (principalmente malato) a los bacteroides, que lo usan como fuente de carbono y energía para su mantenimiento y para el costoso proceso de fijación de nitrógeno atmosférico, mientras que los bacteroides aportan nitrógeno combinado a la planta (White *et al.*, 2007). La simbiosis rizobio-leguminosa es uno de los principales contribuyentes a la FBN, por lo que tiene un gran impacto en la productividad de los cultivos de leguminosas y no leguminosas, así como en el ciclo global del nitrógeno (Herridge *et al.*, 2008).

Según el “Comité de Taxonomía de *Rhizobium* y *Agrobacterium*” el grupo de los rizobios estaba compuesto en 2007 por 14 géneros (Willems, 2006), de los cuales 9 pertenecen al orden *Rhizobiales*: *Bradyrhizobium*, *Ochrobactrum*, *Azorhizobium*, *Devosia*, *Methylobacterium*, *Mesorhizobium*, *Phyllobacterium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium* (Madigan *et al.*, 2015). Recientemente el término *Sinorhizobium* (Chen *et al.*, 1988) se ha sustituido por uno más antiguo, *Ensifer* (Casida, 1982; Martens *et al.*, 2007),

al describirse ambos géneros como el mismo taxón. Sin embargo, en esta Tesis mantendremos el nombre de *Sinorhizobium* ya que es así como es nombrado en la mayoría de la literatura científica, incluyendo las publicaciones más recientes.

3. *Sinorhizobium fredii*.

El género *Sinorhizobium* agrupa a diferentes especies de rizobios de crecimiento rápido, algunos de los cuales, como *Sinorhizobium fredii* y *Sinorhizobium xinjiangense*, son originarios de China (etimológicamente *Sinorhizobium* significa rizobio chino) (Chen, 1988), aunque algunas estirpes de *S. fredii* se han aislado en otros países como Nueva Guinea, Vietnam, Panamá (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2011) o incluso España (Torres-Tejerizo *et al.*, 2012). La estirpe *Sinorhizobium fredii* HH103, empleada en esta Tesis, es uno de los rizobios con mayor rango de nodulación conocido (Margaret *et al.*, 2011), capaz de nodular tanto especies de leguminosas formadoras de nódulos determinados, por ejemplo soja (*Glycine max*) o caupí (*Vigna unguiculata*), como especies que forman nódulos indeterminados, *Glycyrrhiza uralensis* (Pueppke y Broughton, 1999; Vinardell *et al.*, 2015). HH103, a diferencia de otras estirpes de *S. fredii* que solo nodulan variedades asiáticas de soja, es capaz de nodular efectivamente numerosos cultivares americanos y asiáticos de esta planta. Sin embargo, la estirpe NGR234, que presenta el mayor rango de nodulación conocido (al menos 112 géneros de leguminosas), no establece simbiosis con *G. max* pero sí es capaz de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en algunas variedades asiáticas de soja salvaje (*Glycine soja*) (Temprano-Vera *et al.*, 2018). Por otro lado, la estirpe USDA257 es capaz de nodular al menos 79 géneros y 135 especies de leguminosas (Pueppke y Broughton, 1999) pero, curiosamente, induce nódulos fijadores de nitrógeno sólo en las variedades de soja asiáticas y no en las americanas o genéticamente mejoradas.

S. fredii HH103 presenta un genomio complejo (~7,2 Mb) organizado en 7 replicones: el cromosoma (~4,3 Mb) y 6 plásmidos denominados con una letra en función de su tamaño: pSfHH103a1 (~24 Kb), pSfHH103a2 (~25 Kb), pSfHH103b (~62 Kb), pSfHH103c (~144 Kb), pSfHH103d (~589 Kb) y pSfHH103e (~2,1 Mb) (Weidner *et al.*, 2012; Vinardell *et al.*, 2015). Los dos plásmidos de mayor tamaño (pSfHH103e y pSfHH103d), son indispensables para la simbiosis ya que albergan numerosos genes implicados en la producción de diversos polisacáridos superficiales (otros de estos genes están en el cromosoma) y genes de nodulación y fijación, respectivamente. En la **Tabla**

1 se recoge información detallada sobre algunas características de los diferentes replicones de HH103.

Tabla 1. Información obtenida en la secuenciación del genoma de *S. fredii* HH103 (Vinardell *et al.*, 2015).

Genoma de <i>S.fredii</i> HH103				
	Tamaño (Kb)	G + C (%)	Secuencias codificantes (CDS)	ARNt
Cromosoma	4.306	62,61	4.014	53
pSfHH103e	2.096	62,38	1.991	0
pSfHH103d	589	59,59	667	1
pSfHH103c	144	58,68	169	0
pSfHH103b	62	58,47	62	0
pSfHH103a1	24	58,21	19	0
pSfHH103a2	25	58,02	38	0

4. Interacción rizobio-leguminosa.

La interacción rizobio-leguminosa es un proceso coordinado en el espacio y en el tiempo que requiere el establecimiento de un diálogo molecular muy complejo en el que participan señales y receptores de ambos simbioses (Gibson *et al.*, 2008). Este diálogo molecular entre los dos miembros de la simbiosis conlleva la expresión coordinada de un gran número de genes (D’Haeze y Holsters, 2002; Patriarca *et al.*, 2004; Kondorosi *et al.*, 2013).

El proceso se inicia cuando los rizobios son atraídos quimiotácticamente por compuestos fenólicos exudados por las raíces de las leguminosas, los flavonoides. Los flavonoides son compuestos fenólicos derivados de la 2-fenil-1,4-benzopirona que se secretan en bajas cantidades y de manera continua por las raíces, pero su concentración aumenta en la rizosfera si en ésta existen rizobios compatibles con la leguminosa (Broughton *et al.*, 2000). Cada leguminosa secreta un conjunto específico de flavonoides, de manera que cuanto mayor sea el número de flavonoides reconocidos por un rizobio, mayor podrá ser, en principio, su rango de nodulación (Parniske y Downie, 2003). Esta característica constituye el primer nivel de especificidad de la simbiosis (Hassan y Mathesius, 2012).

Los flavonoides exudados por las raíces de la planta interactúan con la proteína bacteriana NodD activando la transcripción de los genes de nodulación bacterianos. NodD se expresa constitutivamente y codifica un regulador transcripcional de tipo LysR que, en presencia de los flavonoides adecuados, reconoce y se une a *nod boxes* (NB) (Perret *et al.*, 2000), secuencias promotoras localizadas aguas arriba de los genes de nodulación, activando su transcripción (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). Entre estos genes se encuentran aquellos cuya expresión resulta en la producción de unos lipoquitoligosacáridos o LCOs llamados factores Nod (NF, del inglés *Nod Factor*) que a su vez son reconocidos por unos receptores específicos en la raíz y provocan diversos efectos en ésta como la curvatura del pelo radical e inicio de la formación del primordio nodular en el córtex radical (Gage, 2004; Jones *et al.*, 2007; Kelly *et al.*, 2017). Como luego se detallará (capítulo 4), además de NodD, pueden intervenir otros reguladores simbióticos, positivos o negativos, en la expresión de los genes de nodulación. Una vez que los LCOs se unen a sus receptores en la membrana del pelo radical, activan en la planta la vía temprana de señalización mediada por NFs (Marsh *et al.*, 2007).

Los rizobios se adhieren a la punta de los pelos radicales en desarrollo a través de una serie de interacciones, tanto específicas (en las que participan proteínas de la planta denominadas lectinas y polisacáridos superficiales de la bacteria, o bien una proteína rizobiana denominada ricadhesina que se une a un receptor radical en presencia de iones Ca^{2+}) como inespecíficas (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007). Esta unión inicial puede estabilizarse gracias a la síntesis de microfibrillas de celulosa por parte del rizobio. Por otro lado, los NFs del rizobio interactúan con sus receptores presentes en la membrana del pelo radical. Cuando los NFs son adecuados, su percepción induce varias respuestas en la planta. Una de ellas es la curvatura del pelo radical (proceso dependiente de calcio) que hace que se adopte una forma similar a la de un cayado de pastor, quedando los rizobios atrapados en el bolsillo formado por el pelo radical (Geurts y Bisseling, 2002). La invasión de la raíz por los rizobios requiere la formación de una estructura tubular que penetra en las células de la planta, el denominado tubo de infección. Esta estructura tubular se origina por invaginación de la membrana citoplasmática del pelo radical, creciendo hacia el interior de éste. Los rizobios ocupan este espacio y comienzan a multiplicarse en su interior a la vez que van penetrando en la raíz (Jones *et al.*, 2007; Kondorosi *et al.*, 2013).

Paralelamente a la formación del tubo de infección, los NFs de los rizobios activan el ciclo celular de las células corticales de la raíz (Gage, 2004; Kondorosi y Kondorosi,

2004, Patriarca *et al.*, 2004). La división celular en el córtex radical permite la formación del primordio nodular dentro de los cuales una población de células se va a diferenciar mediante endoreduplicación, lo que resulta en células poliploides de gran tamaño (células simbióticas) destinadas a acoger y alimentar cientos o miles de bacterias (Vinardell *et al.*, 2003; Gibson *et al.*, 2008; Suzaki *et al.*, 2015).

El tubo de infección libera los rizobios en el primordio nodular, el cual continúa su desarrollo hacia un nódulo funcional (Perret *et al.*, 2000). Los rizobios liberados del tubo de infección se diferencian en bacteroides: bacterias modificadas con forma irregular rodeadas de una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidea. El bacteroide (o grupo de bacteroides) rodeado de la membrana peribacteroidea se denomina simbiosoma (Gibson *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012; Oldroyd, 2013). Una vez que los bacteroides maduran, son capaces de reducir el N_2 a NH_4^+ por la acción del complejo enzimático denominado nitrogenasa. La función del nódulo es producir un ambiente propicio para la fijación de nitrógeno por parte de la bacteria, restringiendo el flujo libre de oxígeno, que de otro modo limitaría la actividad de la enzima nitrogenasa (Oldroyd, 2013).

La entrada de los rizobios a través de tubos de infección se considera la vía de infección más evolucionada. Sin embargo, existe una vía más ancestral de entrada de los rizobios al interior de la raíz: infección intercelular (Ibáñez *et al.*, 2017). En algunos casos la entrada se produce a través de heridas o roturas del tejido epidérmico en las raíces laterales o tallos (la denominada entrada por rotura o en inglés, *crack entry*) (Goormachtig *et al.*, 2004; Madsen *et al.*, 2010). Además, el *crack entry* es un sistema que puede desarrollarse de forma dependiente de NFs (Madsen *et al.*, 2010) o, como ocurre en especies de *Bradyrhizobium*, de forma independiente de NFs (Giraud *et al.*, 2007) (**Figura 1**). En este último caso, la formación del primordio nodular es inducida gracias a la estimulación de un aumento de producción de citoquininas.

La forma y la anatomía del nódulo dependen exclusivamente de la planta y tiene relación con la posición taxonómica (Sprent, 2007). Existen principalmente dos tipos de morfología de nódulos: indeterminados y determinados (Gage, 2004; Patriarca *et al.*, 2004). Los nódulos indeterminados son típicos de leguminosas de climas templados como *Medicago sativa* (alfalfa), *Pisum sativum* (guisante) y *Trifolium spp.* (tréboles). Este tipo de nódulo es alargado y tiene un meristemo apical persistente que continuamente da lugar a nuevas células nodulares que posteriormente serán infectadas por los rizobios presentes en el nódulo. Los nódulos de tipo determinado, característicos de leguminosas que se

desarrollan en climas tropicales y subtropicales como *Glycine max* (soja), *Phaseolus vulgaris* (judía) y *Lotus japonicus*, son redondeados y su actividad meristemática es transitoria (Deakin y Broughton, 2009), de modo que se genera una masa esférica de células que se diferenciarán al unísono. Los nódulos indeterminados comienzan la división celular en el córtex interno a diferencia de los nódulos determinados que comienzan la división celular en el córtex externo (Ferguson *et al.*, 2010).

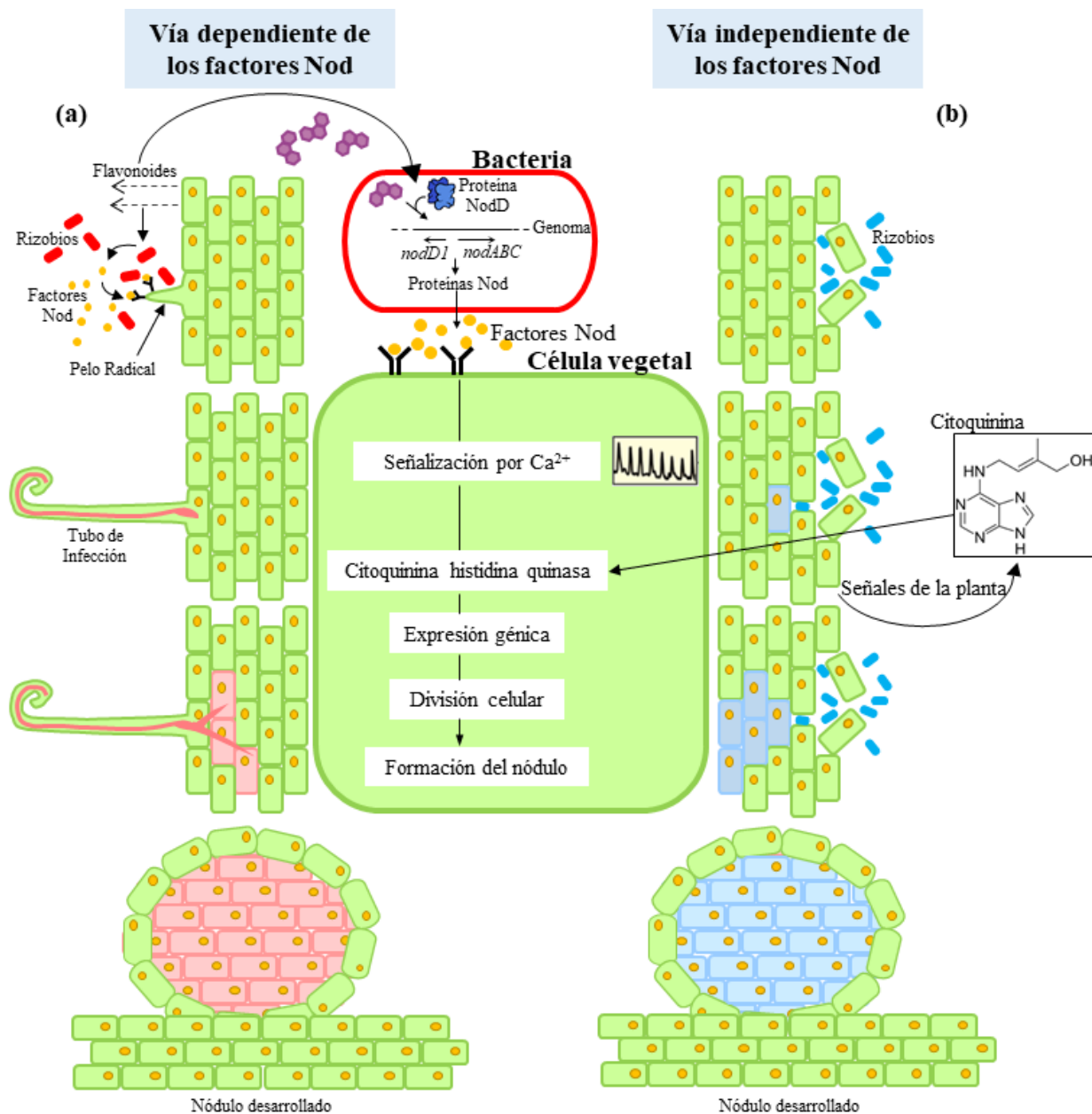


Figura 1. Proceso de nodulación a través de las vías dependiente e independiente de los NFs. **(a)** Inducción de la formación de nódulos en las leguminosas por la vía dependiente de los NFs. Los flavonoides liberados por las raíces de las leguminosas desencadenan la síntesis de NFs rizobianos, los cuales, a su vez, inducen la curvatura del pelo radical, la formación del tubo de infección y la división de las células corticales para

formar el primordio nodular. **(b)** Proceso de formación del nódulo independiente de los NFs. La acumulación en la zona de infección de compuestos como la citoquinina, sintetizados por la bacteria, podría disparar la organogénesis del nódulo directamente. En este caso, los rizobios penetran en la raíz mediante la ruptura de la capa de células epidérmicas y después invaden las células vegetales del nódulo.

5. Factores Nod.

Los NFs, también conocidos como LCOs (lipoquitooligosacáridos), constituyen una clase de moléculas de señalización que desempeñan papeles clave en la interacción planta-microorganismo como la inducción de la organogénesis nodular y el control de la infección, conduciendo a la formación de los nódulos radicales en la leguminosa, donde los bacteroides fijarán el nitrógeno atmosférico (D’Haeze y Holters, 2002). Los LCOs presentan un esqueleto oligosacárido de 3 a 6 residuos de N-acetil-D-glucosamina (NAcGlc) unidos por enlaces glucosídicos β -1,4. La unidad terminal de glucosamina no reductora está *N*-acilada por un ácido graso (Lerouge *et al.*, 1990; Fliegmann y Bono, 2015). Este LCO *N*-acilado puede ser decorado con una amplia variedad de sustituyentes que se unen a las unidades de NAcGlc tales como grupos acetilo, sulfato, carbamoilo, metilo, etc. (Perret *et al.*, 2000; Downie, 2010) (**Figura 2**).

Los LCOs se producen como consecuencia de la expresión de unos genes bacterianos conocidos como “genes de nodulación”, entre los que se incluyen los genes *nod*, *nol* y *noe*, que codifican enzimas involucradas en la síntesis del esqueleto básico del oligosacárido, en su decoración y en su transporte (Spaink *et al.*, 1995; Downie, 1998; Spaink, 2000). Entre los primeros se encuentran los genes *nodABC*, que forman un operón y que codifican una aciltransferasa, una quitina desacetilasa y una N-acetilglucosamina transferasa, respectivamente. Los genes *nodABC* se denominan comunes y están presentes en todos los rizobios, con la excepción de algunas estirpes de *Bradyrhizobium* capaces de nodular sin producir NFs (Giraud *et al.*, 2007), y sus mutaciones impiden la producción de los LCOs y, por tanto, la nodulación. Los genes *nodIJ* también se consideran comunes y codifican proteínas que pertenecen a la familia de los transportadores ABC involucrados en la secreción de los NFs (Spaink *et al.*, 1995). Sin embargo, en mutantes por delección de los genes *nodI* y *nodJ*, se han encontrado cantidades sustanciales de LCOs secretadas en el medio (Spaink *et al.*, 1995; Cardenas *et al.*, 1996; Fernández-López *et al.*, 1996), lo que indica que deben existir otros mecanismos de transporte operativos. Además, existe una gran diversidad de genes de nodulación que participan en la decoración de los LCOs y que varían entre los diferentes

rizobios. En *S. fredii* HH103 se han identificado los genes *noeK*, *nodZ*, *noeL* y *nolK* (Lamrabet *et al.*, 1999) y *noeI* (Madinabeitia *et al.*, 2002), implicados en la fucosilación y en la metilación del residuo de fucosa del extremo reductor de los LCOs, respectivamente, y cuya inactivación disminuye la capacidad competitiva de *S. fredii* para nodular soja.

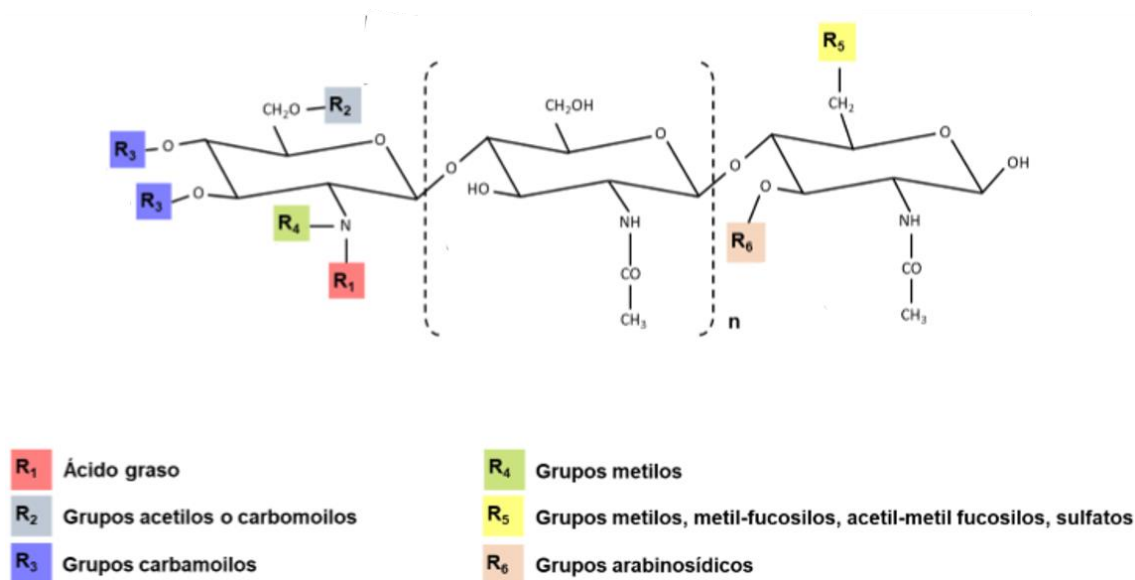


Figura 2. Estructura de los NFs y sus decoraciones descritas. Figura adaptada de Perret *et al.*, 2000.

Los NFs aislados de muchos rizobios han demostrado tener la misma estructura genérica, pero pueden diferir en el número de unidades de N-acetil-D-glucosamina (3-6), en la longitud y en el grado de insaturación de la cadena del ácido graso, así como en la presencia o ausencia de sustituyentes en el esqueleto oligosacárido (Dénarié *et al.*, 1992; Olsthoorn *et al.*, 1998). Estas variaciones son características de cada rizobio y están involucradas en el reconocimiento específico que tiene lugar entre la planta leguminosa y su simbiote (Dénarié *et al.*, 1996). Por tanto, cada estirpe rizobiana produce no solo un tipo de NF sino un conjunto de diferentes NFs que son importantes para la determinación del rango del hospedador (Perret *et al.*, 2000; Downie, 2010; López-Baena *et al.*, 2016).

6. Reguladores transcripcionales implicados en simbiosis.

La expresión de los genes de nodulación rizobianos está sujeta a una compleja regulación. Los rizobios contienen al menos una copia de la proteína NodD que, tras su interacción con los flavonoides apropiados, actúa como regulador positivo del regulón *nod* (genes cuya expresión está mediada por la proteína NodD). Sin embargo, existen más

reguladores transcripcionales involucrados en la modulación de la expresión de los genes de nodulación, incluyendo copias adicionales de NodD que pueden actuar como inductores o represores de los genes *nod* (Perret *et al.*, 2000).

6.1. NodD.

La proteína reguladora NodD se expresa constitutivamente y codifica un activador transcripcional de tipo LysR que, en presencia de flavonoides específicos, reconoce y se une a *nod boxes* (NB), secuencias promotoras localizadas aguas arriba de los genes de nodulación, activando la transcripción de éstos (Schlaman *et al.*, 1998; Spaink, 2000, Peck *et al.*, 2006; Pérez-Montaña *et al.*, 2016b), así como la del gen *ttsI*, cuyo producto (TtsI) se une a *tts boxes* (TB), induciendo la expresión de los genes responsables del ensamblaje de la maquinaria del sistema de secreción de tipo 3 (T3SS), y de la producción y secreción de efectores a través de dicho sistema. En nuestro laboratorio, se han realizado estudios de RNAseq y qRT-PCR (qPCR) para analizar la expresión génica global de *S. fredii* HH103 en presencia y ausencia de genisteína, un flavonoide inductor de los genes *nod* en esta cepa. Se han identificado tres grupos de genes expresados diferencialmente tras el tratamiento con genisteína: i) genes controlados por NB, ii) genes regulados por TB, y iii) genes no precedidos por un NB o una TB (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). El mecanismo exacto de cómo NodD responde al flavonoide para iniciar la transcripción de los genes *nod* se desconoce (Chen *et al.*, 2005), ya que no hay evidencias bioquímicas que determinen la interacción entre ambos, lo que podría abrir la puerta a que otros componentes pudieran intervenir en la activación de NodD, y, por tanto, en la regulación de los genes *nod*. En *Rhizobium tropici* CIAT 899 se ha observado que la producción de NFs no sólo se induce por apigenina y NodD1, sino que este rizobio posee la capacidad de sintetizar NFs en presencia de estrés osmótico (300 mM de NaCl o 400 mM de manitol) sin la regulación de NodD1, siendo la proteína NodD2 el regulador de los genes *nod* en estas condiciones (Estévez *et al.*, 2009; Guasch-Vidal *et al.*, 2013; del Cerro *et al.*, 2017; 2019).

Los miembros de la familia LysR se caracterizan porque tienen aproximadamente un tamaño de 35 kDa, poseen un dominio de unión a ADN de tipo hélice-vuelta-hélice en su extremo N-terminal, frecuentemente muestran auto-represión y normalmente requieren de moléculas inductoras para llevar a cabo su actividad. Estos inductores influyen en la función de los activadores de tipo LysR en diferentes etapas, durante el inicio de la transcripción, traduciendo directamente las señales extracelulares en cambios en la

transcripción génica (Schell, 1993; Peck *et al.*, 2006). Estas moléculas inductoras pueden afectar a la interacción con el ADN estimulando un cambio de afinidad en la unión con este (Wang *et al.*, 1992; Dangel *et al.*, 2005) o alterar la arquitectura de la proteína (Hryniewicz y Kredich, 1994; Toledano *et al.*, 1994; Parsek *et al.*, 1995; Rhee *et al.*, 1998). También pueden cambiar la conformación de los activadores para dejar expuestos los dominios que interaccionan con la ARN polimerasa, facilitando la formación de complejos transcriptómicos cerrados (Wek y Hatfield, 1988; Adhya *et al.*, 1993; Kullik *et al.*, 1995).

La proteína NodD se ha encontrado en todas las especies de rizobios (Spaink *et al.*, 1987a; Schlaman *et al.*, 1998) y su número de copias varía según la especie (Rodríguez-Quinones *et al.*, 1987; Spaink, 2000), pudiendo haber hasta cinco copias de esta proteína (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). Por ejemplo, en *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 hay tres copias de *nodD* (*nodD1*, *nodD2* y *nodD3*) que contribuyen de manera diferencial a la nodulación en distintas plantas hospedadoras (Göttfert *et al.*, 1986; Honma y Ausubel, 1987; Gyorgypal *et al.*, 1988; Kondorosi *et al.*, 1989). NodD1 y NodD2 de *Mesorhizobium loti* R7A son funcionalmente redundantes para la nodulación, mostrando los mutantes *nodD1* de esta bacteria un ligero retraso en dicho proceso (Rodpothong *et al.*, 2009). Recientemente se ha propuesto que ambos reguladores difieren en cuanto a la preferencia de reconocimiento de diferentes moléculas inductoras, activándose así en los diferentes estadios de la infección (Kelly *et al.*, 2018). *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, *S. fredii* y *R. tropici* poseen una, dos y cinco copias de *nodD* respectivamente (van Rhijn *et al.*, 1993). En concreto, las estirpes de *S. fredii* como HH103, poseen dos copias del gen *nodD*, *nodD1* y *nodD2* (Vinardell *et al.*, 2015). En *S. fredii* NGR234, NodD2 es necesario para la formación de nódulos fijadores de nitrógeno y actúa como represor del operón *nodABC* (Fellay *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2004; Theunis *et al.*, 2004). En *S. fredii* USDA257 y USDA191, la sobreexpresión de *nodD2* reduce la transcripción de *nodD1* (Machado *et al.*, 1998). Además, en *S. fredii* HH103, la inactivación de *nodD2* provoca que la bacteria produzca una mayor cantidad de NFs lo que permite a este rizobio establecer simbiosis efectiva en *L. japonicus*, algo que no ocurre en la estirpe silvestre que tan solo induce la formación de nódulos inefectivos (Acosta-Jurado *et al.*, 2019). En *R. tropici* CIAT 899, NodD1 es el responsable de la activación de los genes *nod* en respuesta a flavonoides inductores como la apigenina, aunque en presencia de estrés osmótico (tanto estrés salino como estrés por manitol) es NodD2 el regulador de los genes *nod* (Guasch-Vidal *et al.*, 2013; del Cerro *et al.*, 2017; 2019).

6.2. NolR.

En *S. meliloti*, la regulación negativa del regulón *nod* está mediada por una proteína represora codificada por el gen *nolR*. Este gen fue identificado por primera vez en *S. meliloti* AK631 como un regulador transcripcional negativo de los principales genes biosintéticos de los NFs (*nodABC*) (Kondorosi *et al.*, 1989; 1991; Sugawara y Sadowsky, 2014). NolR pertenece a la familia de los reguladores de tipo HTH (hélice-vuelta-hélice, del inglés *helix-turn-helix*) ArsR, se une a secuencias conservadas no palindrómicas (Kondorosi *et al.*, 1991; Sugawara y Sadowsky, 2014), y se encuentra bastante conservado en múltiples especies de *Sinorhizobium* y *Rhizobium* (Vinardell *et al.*, 2004a; Lee *et al.*, 2014).

NolR es un regulador global que responde a factores ambientales para “afinar” (*fine-tuning*) la producción de las señales simbióticas rizobianas, no sólo la de los LCOs. La ausencia o presencia de NolR afecta a las interacciones simbióticas con las plantas hospedadoras (Vinardell *et al.*, 2004a; Chen *et al.*, 2000; 2005; López-Baena *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2014). Por ejemplo, NolR reprime la expresión del gen *ttsI* del T3SS, que se requiere para la secreción de las Nops o proteínas efectoras que son beneficiosas para la simbiosis de *S. fredii* HH103 con algunos cultivares de soja (López-Baena *et al.*, 2008). La inactivación, o sobreexpresión de *nolR* disminuye la capacidad de *S. fredii* HH103 para nodular *Glycine max*. Sin embargo, la presencia de múltiples copias de *nolR* en HH103 mejora su capacidad para nodular con *V. unguiculata* (Vinardell *et al.*, 2004b). En *S. medicae* la mutación de *nolR* provoca la represión de la expresión de *nodC* alterando la capacidad de nodulación con diferentes genotipos de *Medicago truncatula* y mejora significativamente el desarrollo de los nódulos en *Medicago tricycla* (Sugawara y Sadowski, 2014). Además, en *S. fredii* HH103, *nolR* potencia la síntesis de exopolisacárido (EPS) (Acosta-Jurado *et al.*, 2016b).

6.3. SyrM.

SyrM, al igual que NodD, pertenece a la familia LysR de activadores transcripcionales (Henikoff *et al.*, 1988) y participa en la regulación de algunos genes rizobianos implicados en simbiosis a través de la unión a regiones de ADN conocidas como SyrM boxes (SB) (Barnett *et al.*, 1996). En *S. meliloti* Rm1021, la expresión de NodD3 se induce por SyrM y, a su vez, NodD3 induce la expresión de SyrM. Además, también se ha visto que en esta bacteria la proteína SyrM induce la expresión de *syrA*, lo que resulta

en la represión de la producción de EPS-I (Swanson *et al.*, 1993, Barnett *et al.*, 1998, Barnett y Long, 2015). En *S. fredii* NGR234, además de dos copias de *nodD*, *nodD1* (esencial para la nodulación en todas las plantas hospedadoras analizadas) y *nodD2* (implicado en la represión del operón *nodABCIIJnolOnoeI*), también existen dos copias de *syrM*, *syrM1* y *syrM2*. El primero activa la transcripción del locus *nolXBTUVW* relacionado con el T3SS y controla la sulfatación de los NFs (Hanin *et al.*, 1998). En cambio, *syrM2*, que se induce por NodD1 y flavonoides a través de la NB19, actúa como un regulador transcripcional positivo de *nodD2* que a su vez reprime la expresión de *nodD1* y, en consecuencia, los genes relacionados con la producción de NFs 24 horas después de la inducción con flavonoides (Kobayashi *et al.*, 2004). *S. fredii* HH103 contiene sólo una copia de *syrM* precedida por un NB funcional (NB19), por lo que su transcripción se activa por la vía dependiente de flavonoides-NodD1 (Vinardell *et al.*, 2015).

7. Polisacáridos superficiales.

El reconocimiento inicial del rizobio por parte de la planta, además de por los factores Nod, se produce a través de ciertos polisacáridos superficiales rizobianos que participan en los procesos de unión a raíces, infección radical y de invasión de las células vegetales del nódulo (Long y Ehrhardt, 1989; Downie, 2010). *S. fredii* HH103 produce diversas clases de polisacáridos. Los más estudiados hasta la fecha son los glucanos cíclicos (GC), los lipopolisacáridos (LPS), los exopolisacáridos (EPS) y los polisacáridos capsulares tipo antígeno-K (KPS) (Frayse *et al.*, 2003; Margaret *et al.*, 2011). Aunque el papel que desempeñan aún no está totalmente dilucidado, estos polisacáridos podrían actuar protegiendo a la bacteria frente a condiciones ambientales y/o frente a las respuestas defensivas de la planta y también como señales durante el proceso de nodulación. Estos polisacáridos se disponen en diferentes zonas de la superficie bacteriana. Los GC se encuentran mayoritariamente en el espacio periplásmico, aunque también se localizan en el exterior celular (Breedveld *et al.*, 1993; Breedveld y Miller, 1994). Los EPS se encuentran en el exterior de la célula, sin unión o con una ligera asociación con la membrana externa. Por último, el LPS y el KPS son constituyentes de la membrana externa (D’Haeze *et al.*, 2004; López-Baena *et al.*, 2016) (**Figura 3**).

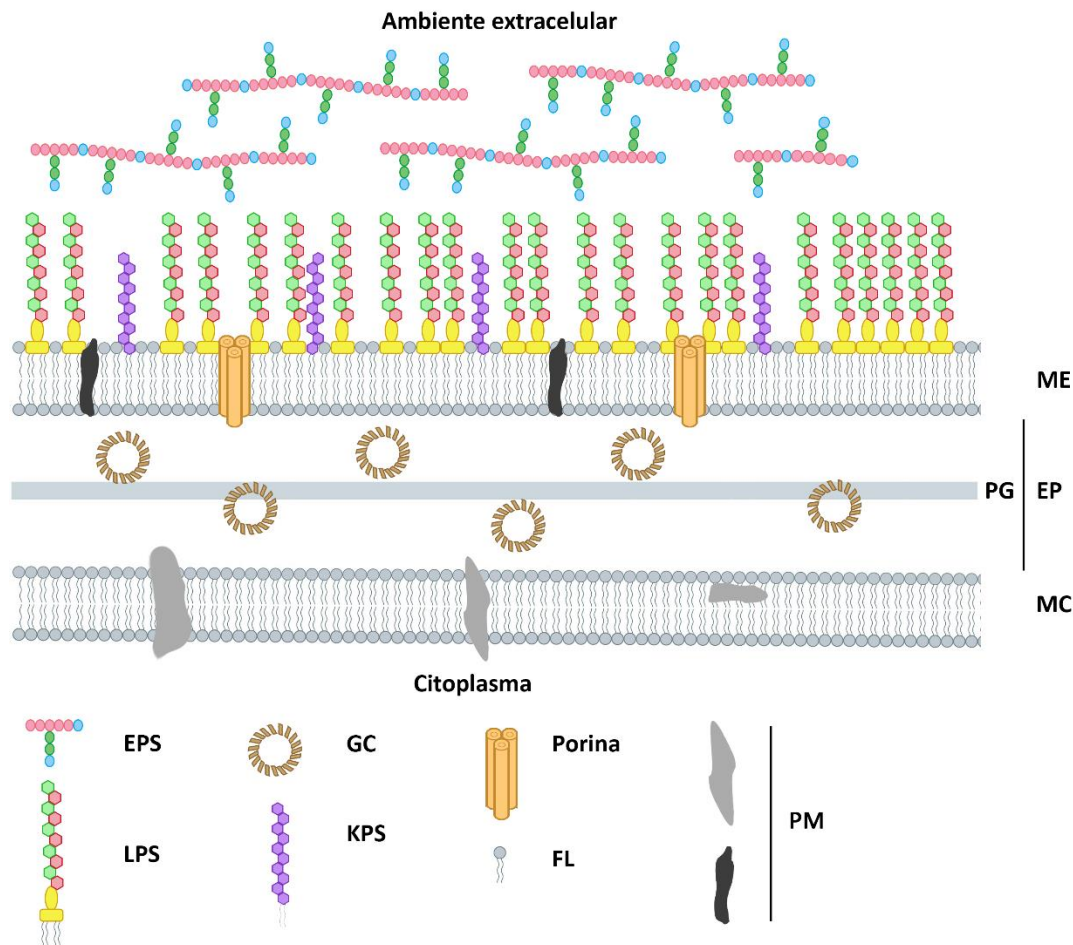


Figura 3. Esquema de la superficie rizobiana en la que se muestra la disposición de los polisacáridos superficiales. ME, Membrana externa. EP, Espacio periplásmico. PG, Capa de peptidoglicano. MC, Membrana citoplasmática. EPS, Exopolisacáridos. GC, Glucanos cíclicos. LPS, Lipopolisacáridos. KPS, Polisacárido capsular de tipo antígeno-K. FL, Fosfolípidos. PM, Proteínas de membrana. Figura adaptada de Vinardell *et al.* (2005) y Acosta-Jurado (2017).

7.1. Polisacárido capsular de tipo antígeno K (KPS).

Los polisacáridos capsulares (Antígenos-K o KPS, de *K-antigen polysaccharide*) son polisacáridos ácidos capsulares análogos al grupo II de antígenos K presentes en *Escherichia coli* (Reuhs *et al.*, 1993; Whitfield, 2006; Downie, 2010; López-Baena *et al.*, 2016). En los rizobios estos polisacáridos inicialmente se describieron en *S. meliloti* y *S. fredii* (Reuhs *et al.*, 1993; 1998). Posteriormente, se describieron en *M. loti* y *R. tropici* (Townsend *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2013). A diferencia de los exopolisacáridos, cuya estructura varía a nivel de especie, la estructura del KPS es específica de cada estirpe (López Baena *et al.*, 2016).

La subunidad estructural del KPS en muchos rizobios es un disacárido constituido por una molécula de Kdo (ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico) o un derivado estructural de éste (Kdx) y una hexosa neutra o un ácido urónico (Reuhs *et al.*, 1998; Fraysse *et al.*,

2003; Le Quéré *et al.*, 2006; Downie, 2010). *S. fredii* HH103 tiene un KPS cuya estructura es un homopolímero en el que la subunidad de repetición está constituida por un derivado del ácido pseudoamínico (Margaret *et al.*, 2011). La inactivación de la producción de KPS en esta estirpe tiene un impacto muy negativo en la simbiosis con distintas plantas hospedadoras (revisado en López-Baena *et al.*, 2016).

7.2. Exopolisacárido (EPS).

Los exopolisacáridos son homo- o heteropolímeros ácidos secretados al exterior celular y localizados en la superficie de la célula. A diferencia del KPS, el EPS muestra muy poca o ninguna asociación con la célula (Becker y Pühler, 1998; López-Baena *et al.*, 2016). El EPS está ampliamente distribuido en bacterias y proporciona protección contra diferentes estreses como la desecación o la presencia de compuestos antimicrobianos, participa en la adhesión a superficies y formación de biopelículas (*biofilms*), y también puede contribuir a la adquisición de nutrientes (Frayse *et al.*, 2003; Janczarek, 2011; Acosta-Jurado *et al.*, 2016b). La composición del EPS es muy variable. En los rizobios, los azúcares más frecuentes son D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, L-ramnosa y los ácidos D-glucurónico y D-galacturónico, mientras que las sustituciones más abundantes son grupos acetilo, piruvilo, succinilo e hidroxibutanoílo (Becker y Pühler, 1998; Downie, 2010; Janczarek, 2011).

El EPS rizobiano parece jugar también un papel destacado en la simbiosis. Aunque tradicionalmente se le ha atribuido un papel más importante en las interacciones que forman nódulos de tipo indeterminado, tales como *S. meliloti-Medicago* o *R. leguminosarum* bv. *trifolii-Trifolium* (Frayse *et al.*, 2003; Janczarek, 2011), trabajos recientes muestran que el reconocimiento del EPS adecuado por un receptor de la planta es crucial para el éxito del proceso de nodulación en la simbiosis formadora de nódulos determinados *M. loti-L. japonicus* (Kawaharada *et al.*, 2015). En el caso de *S. fredii* HH103, el EPS no sólo es dispensable para la nodulación con soja, sino que mutantes carentes de este polisacárido son más competitivos para nodular en esta planta (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). Además, la producción de EPS en esta estirpe es reprimida por NodD1 en presencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación e inducida por NodR (Vinardell *et al.*, 2004b; Acosta-Jurado *et al.*, 2016b).

7.3. Glucanos cíclicos (GC).

Los glucanos cíclicos (GC) se localizan y acumulan en el periplasma de la bacteria (Frayssse *et al.*, 2003). No obstante, también se pueden encontrar en el medio extracelular, variando su presencia entre las distintas especies. Aislados por primera vez en *S. meliloti*, los glucanos cíclicos son moléculas circulares compuestas por residuos de glucosa unidos por enlaces glucosídicos β -(1,2) en las cuales pueden aparecer diferentes sustituciones moleculares (D'Antuono *et al.*, 2005; Kawaharada *et al.*, 2010). Los GC producidos por *S. fredii* HH103 contienen de 18 a 24 residuos de glucosa y presentan fosfoglicerol como único posible sustituyente (Crespo-Rivas *et al.*, 2009).

Estas moléculas desempeñan papeles tanto a nivel intracelular como extracelular. Sus funciones intracelulares incluyen la osmoprotección y la estabilización estructural de la envuelta celular, incluyendo el ensamblaje del flagelo. Las funciones extracelulares parecen estar relacionadas con el diálogo que tiene lugar entre la bacteria y su hospedador, particularmente modulando la respuesta del huésped en aquellas bacterias que interactúan con plantas o animales, donde interfieren, alteran o activan las vías de señalización debido a la capacidad de señalar a través de complejos moleculares o de activar receptores de la respuesta inmune (Guidolin *et al.*, 2018). Por tanto, cada vez que se ha estudiado el papel de los GC en las interacciones bacteria-hospedador, se ha visto que son un componente esencial de la envuelta bacteriana, necesaria para la simbiosis o la virulencia.

Quizás debido a sus posibles numerosas funciones tanto en vida libre como en la interacción simbiótica, todos los mutantes rizobianos defectivos en la producción de GC estudiados hasta la fecha están afectados de modo muy negativo en simbiosis (D'Antuono *et al.*, 2005; Crespo-Rivas *et al.*, 2009).

7.4. Lipopolisacárido (LPS).

Uno de los mecanismos de defensa más importantes de las bacterias Gram-negativas frente a condiciones adversas en el medio extracelular es el lipopolisacárido (LPS), que es el componente mayoritario de la membrana externa rizobiana (Jones *et al.*, 2007). El LPS está constituido por el lípido A, que actúa de anclaje a la membrana externa, el *core* o núcleo oligosacárido, y, en la mayoría de los casos, de una cadena polisacáridica-O (antígeno-O) (Campbell *et al.*, 2002; Frayssse *et al.*, 2003; Janczarek *et al.*, 2015; Choma *et al.*, 2017).

En los rizobios se pueden diferenciar dos tipos de LPS cuando se analizan en geles de acrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE): el LPS rugoso (R-LPS, del inglés *rough*-LPS), que consiste en el lípido A y el *core* oligosacárido, y el LPS liso (S-

LPS, del inglés *smooth-LPS*), que también incluye al antígeno-O unido al *core* oligosacarídico (Campbell *et al.*, 2002).

Aunque las funciones simbióticas que desempeña el LPS rizobiano no están aún totalmente elucidadas, se pueden dividir principalmente en un papel directo en la simbiosis, como la infección radical, la liberación bacteriana en las células del nódulo, la multiplicación de simbiosoma, y la formación del bacteroide o en el fomento de la simbiosis debido a las funciones asociadas con la protección del rizobio contra los compuestos defensivos de la planta o inhibiendo los mecanismos de defensa del huésped (Carlson *et al.*, 2010; López-Baena *et al.*, 2016). Muchos mutantes rizobianos en el LPS muestran diversas deficiencias simbióticas que van desde la inducción únicamente de pseudonódulos carentes de bacterias (Stacey *et al.*, 1991) hasta la senescencia temprana de los nódulos fijadores de nitrógeno (Campbell *et al.*, 2002; Margaret *et al.*, 2013).

8. Hopanoides.

Los terpenoides, también conocidos como isoprenoides, se forman por condensación de dos o más unidades de isopreno. Son uno de los grupos de productos naturales más abundantes en el planeta (Vranová *et al.*, 2013) y se encuentran en todos los ámbitos de la vida. En algunos organismos, los terpenoides regulan procesos metabólicos esenciales, incluyendo el crecimiento, la fotosíntesis y la respiración. Más comúnmente, los terpenoides forman metabolitos secundarios que median las interacciones entre los organismos y sus entornos (Belin *et al.*, 2018).

Los hopanoides pertenecen a la subclase de los triterpenoides cíclicos, un grupo estructuralmente diverso de moléculas sintetizadas por la ciclación del escualeno y de su derivado oxigenado 2,3-oxidoescualeno (Abe, 2007). Estas reacciones químicamente complejas son catalizadas por la superfamilia de enzimas ciclasas triterpenoides. Existen más de una docena de familias de ciclasas triterpenoides que producen diversas clases de triterpenoides monocíclicos y policíclicos (Christianson, 2006; Abe, 2007). Una de las mayores familias de estas enzimas son las hopano-escualeno ciclasas (*Squalene-Hopene Cyclases*, SHCs). Las SHCs pueden sintetizar triterpenoides cíclicos directamente desde el escualeno en un proceso independiente de oxígeno formando hopanoides C₃₀ (**Figura 4**) (Rohmer *et al.*, 1980; Belin *et al.*, 2018).

Aproximadamente el 10% de las bacterias pueden producir hopanoides (es decir, contienen el gen *shc*) (Ourisson *et al.*, 1979; Fischer *et al.*, 2005; Racolta *et al.*, 2012). El

grupo con la mayor presencia de genes *shc* es el de las proteobacterias, particularmente la familia de α -proteobacterias *Bradyrhizobiaceae* y el género de las β -proteobacterias *Burkholderia*, que incluye tanto bacterias asociadas a plantas como patógenos humanos (Belin *et al.*, 2018). Aunque a menudo se asume que los hopanoides son específicos de bacterias, también se han aislado de varios árboles tropicales, pastos, líquenes y helechos (Inayama *et al.*, 1989).

En la mayoría de los casos, el gen *shc* forma parte del operón *hpn* (*hopanoid biosynthesis*), que codifica enzimas implicadas en la biosíntesis del terpenoide y en las modificaciones estructurales de éste (Perzl *et al.*, 1998). Las modificaciones más comunes de los hopanoides incluyen la metilación en la posición C2, a través de la enzima hopanoide 2-metiltransferasa HpnP (Welander *et al.*, 2010) formando los 2-metil-hopanoides (2Me-hopanoides), o en la posición C3 por la enzima hopanoide C3 metilasa HpnR (Welander y Summons, 2012) formando los 3-metil-hopanoides (3Me-hopanoides) y la adición de una cadena lateral derivada de la ribosa por la enzima HpnH (Welander *et al.*, 2012), que se encuentra en casi todas las bacterias productoras de hopanoides (Bradley *et al.*, 2010).

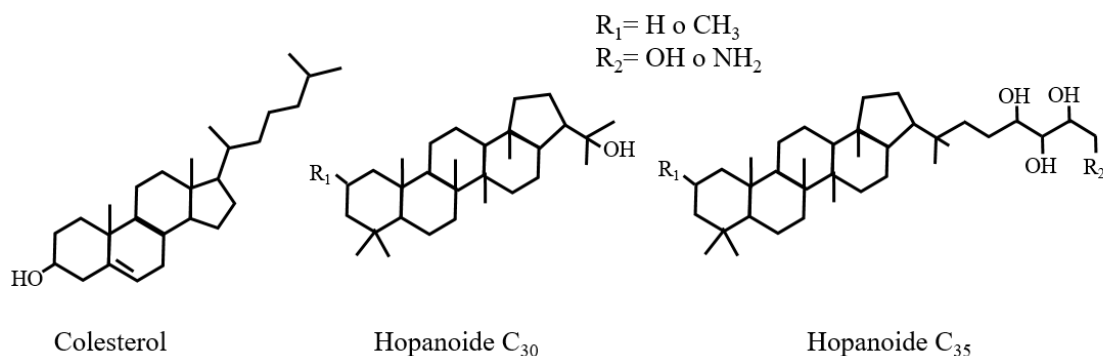


Figura 4. Comparación estructural entre el colesterol y diversos hopanoides. C₃₀: hopanoide “no extendido”. C₃₅: hopanoide “extendido”. Cuando R₁ es H, el hopanoide C₃₀ se denomina diplopterol. Cuando R₁ es H y R₂ es OH, el hopanoide C₃₅ se denomina bacteriohopanetetrol (BHT). Figura adaptada de Doughty *et al.*, 2011.

Debido a sus estructuras planas e hidrófobas, los esteroides eucariotas y los hopanoides pueden intercalarse en las bicapas lipídicas e interactuar con otros lípidos para alterar las propiedades biofísicas de las membranas pudiendo condensar, espesar y disminuir la permeabilidad de las membranas proporcionando a la bacteria una barrera contra los estreses externos (Belin *et al.*, 2018).

Se ha estudiado el papel de los hopanoides en las interacciones beneficiosas entre plantas y bacterias en los nódulos de raíces. La producción de hopanoides ocurre

predominantemente en rizobios que se asocian con leguminosas tropicales (Sy *et al.*, 2001; Lemaire *et al.*, 2016). En *Bradyrhizobium* sp. BTAi1, un mutante Δshc que carece de hopanoides presenta defectos severos en la integridad de la membrana externa, lo que provoca un crecimiento más lento en condiciones óptimas y resiste menos a las tensiones que imitan el microambiente del nódulo de la raíz (como pH ácido, hipoxia, alta osmolaridad y péptidos antimicrobianos) en comparación con la estirpe silvestre. En simbiosis con la leguminosa hospedadora *Aeschynomene evenia*, el mutante Δshc indujo la formación de nódulos fijadores de nitrógeno pero con senescencia prematura. Este hecho puede reflejar una incapacidad para mantener una infección persistente del hospedador, tal vez debido a un defecto de supervivencia a largo plazo (Silipo *et al.*, 2014).

9. Sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram-negativas.

Los sistemas de secreción que poseen las bacterias son nanomáquinas especializadas en enviar proteínas y otras moléculas biológicas al exterior, y permiten a las bacterias interactuar con el medio en el que se encuentran, así como con otros organismos que forman parte de su hábitat (Cabañas-Romero y Huerta-Saquero, 2014). Muchas bacterias Gram-negativas son capaces de secretar proteínas a través de la membrana externa mediante estos sistemas de secreción. Hasta la fecha se han identificado nueve sistemas de secreción diferentes, T1SS-T9SS (**Figura 5**), del inglés *Type (1-9) Secretion System* (Desvaux *et al.*, 2009; Glew *et al.*, 2012), que se clasifican según la naturaleza molecular de la maquinaria de transporte y las reacciones que catalizan (Lee y Schneewind, 2001).

Cada uno de los sistemas de secreción ha evolucionado independientemente y contiene un conjunto básico de proteínas diferentes (Nelson y Sadowski, 2015). Entre los sistemas de secreción que translocan proteínas a través de la membrana externa bacteriana se encuentran aquellos que liberan las proteínas al medio extracelular (T1SS, T2SS y T5SS), los que inyectan las proteínas al interior del citoplasma de las células de un hospedador eucariota (T3SS, T4SS y T6SS), o al de bacterias (T6SS), y otros que se requieren para la biosíntesis de apéndices en la superficie de la bacteria (T7SS, T8SS y T9SS) (Desvaux *et al.*, 2009; Glew *et al.*, 2012). Los T1SS, T3SS, T4SS, T6SS y T9SS se componen de un conjunto de proteínas que atraviesan las membranas interna y externa de la bacteria, promoviendo la secreción de las proteínas en un solo paso (Rego *et al.*, 2010). Sin

embargo, los sistemas T2SS, T5SS, T7SS y T8SS solo forman un canal en la membrana externa (Dautin y Bernstein, 2007).

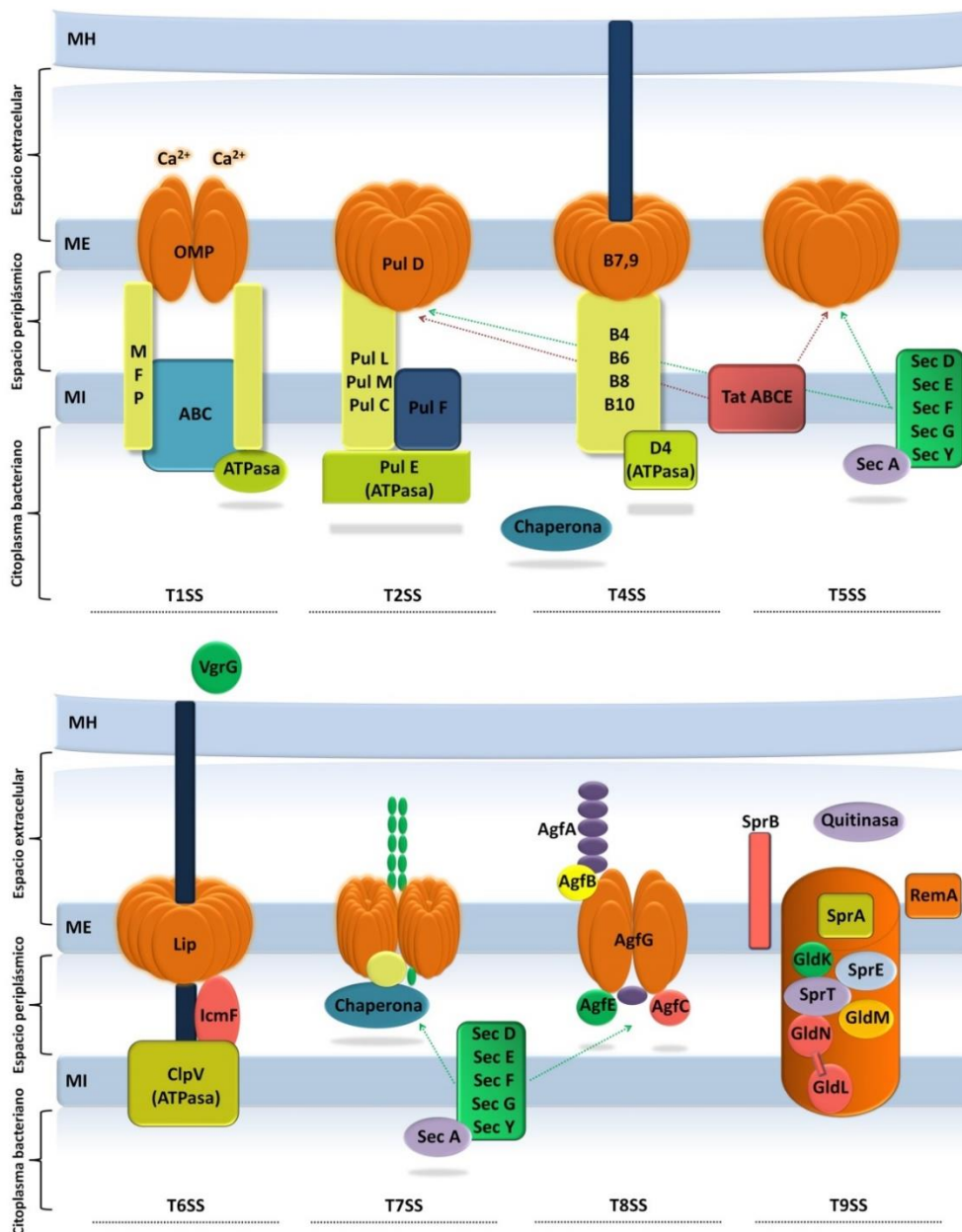


Figura 5. Sistemas de secreción de las bacterias Gram-negativas. MH, Membrana del hospedador. ME, Membrana externa bacteriana. MI, Membrana interna bacteriana. Jiménez-Guerrero (2015).

La secuenciación de diversas estirpes rizobianas ha demostrado que estas bacterias suelen contener múltiples sistemas de secreción, aunque su presencia en el genoma no significa que tengan un papel en la simbiosis. En general, los rizobios contienen el T3SS, T4SS, T5SS y T6SS, y éstos presentan una alta homología con los que poseen los patógenos bacterianos (Nelson y Sadowski, 2015; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2016). En los últimos años, se ha demostrado que los T3SS, T4SS y T6SS están involucrados en la

simbiosis con leguminosas, ya que éstos traslocan al interior de las células del hospedador unas proteínas conocidas como efectores que suprimen y/o subvierten la respuesta defensiva de la planta, promoviendo en algunos casos la formación de los nódulos (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2015).

9.1. El sistema de secreción de tipo 3 (T3SS).

El sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) atraviesa la membrana externa, así como la pared celular y la membrana de la célula hospedadora, y permite el transporte de proteínas desde la bacteria al interior de la célula vegetal, donde ejercen diferentes funciones que repercutirán en el propio beneficio de la bacteria (Galán *et al.*, 2014). En concreto, el T3SS parece estar involucrado en la determinación del rango de hospedador de la bacteria y en la eficiencia de la nodulación (Yang *et al.*, 2010).

La morfología del T3SS, tanto de patógenos de animales como de plantas, muestra una estructura común básica similar a la del cuerpo basal del flagelo, siendo una adaptación del flagelo a una nueva y diferente función a la que tenía (Pallen *et al.*, 2005) (**Figura 6**). La estructura o cuerpo basal de este sistema de secreción se extiende desde la membrana interna (MI) a la membrana externa (ME) (Tamano *et al.*, 2000). El cuerpo basal se conecta con una estructura extracelular alargada y hueca denominada en los rizobios *pilus*, el cual forma un conducto estrecho necesario para la secreción e inyección de proteínas, llamadas efectores, directamente al interior de la célula (López-Baena *et al.*, 2016).

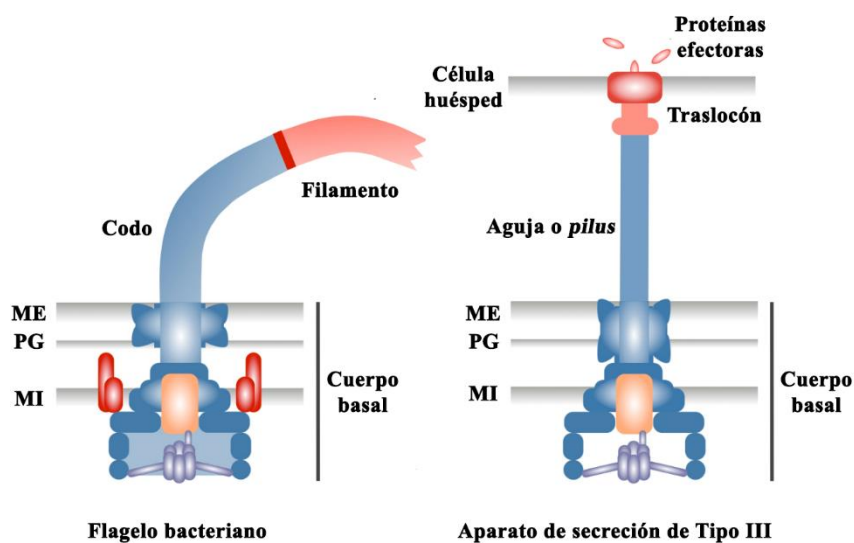


Figura 6. Representación esquemática del flagelo bacteriano (izquierda) y el T3SS (derecha). ME, Membrana externa bacteriana. MI, Membrana interna bacteriana. PG, Capa de petidoglicano. Imagen adaptada del laboratorio de Marc Erhardt (<https://www.baktphys.hu-berlin.de/projects.html>).

Los efectores o Nops (del inglés *Nodulation outer proteins*) son proteínas rizobianas secretadas a través del T3SS que ejercen su función principalmente dentro de la célula hospedadora (Pallen *et al.*, 2003; Tampakaki, 2014) donde alteran rutas de señalización y suprimen la respuesta defensiva, proporcionando un ambiente beneficioso para la multiplicación bacteriana (Jones y Dangl, 2006; Jiménez-Guerrero *et al.*, 2015; López-Baena *et al.*, 2016). La ausencia de estos efectores puede ser beneficiosa, no tener efecto o resultar perjudicial para la interacción simbiótica, dependiendo de la pareja específica de simbioses. En las situaciones más extremas, el reconocimiento de un efector por parte de la planta bloquea completamente la nodulación. En el caso concreto de la simbiosis de *S. fredii* HH103 con soja, la inactivación del T3SS afecta negativamente al establecimiento de la misma en los estadios tempranos del proceso, lo cual está asociado con la reducción de la expresión de los genes de nodulación temprana de la planta (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2015). En cambio, la inactivación del T3SS de HH103 mejora notablemente su capacidad simbiótica con otra leguminosa, *Erythrina variegata* (de Lyra *et al.*, 2006).

Los genes del T3SS de los rizobios se encuentran localizados en regiones de entre 30 y 47 kb denominadas islas simbióticas. Éstas, dependiendo del rizobio, se localizan en el cromosoma o en los plásmidos simbióticos, donde también se encuentran los genes de nodulación y de fijación de nitrógeno (Freiberg *et al.*, 1997; Viprey *et al.*, 1998; Kaneko *et al.*, 2000; Göttfert *et al.*, 2001; Marie *et al.*, 2001; Krishnan *et al.*, 2003; de Lyra *et al.*, 2006). En los rizobios, el conjunto de los genes del T3SS recibe el nombre de región *tts* (del inglés, *type three secretion*) (Troisfontaines y Cornelis, 2005). Los genes estructurales del T3SS de los rizobios se denominan *rhc*, del inglés, *rhizobium conserved* (Viprey *et al.*, 1998; Marie *et al.*, 2001). En *S. fredii*, de todos los genes de esta agrupación sólo *ttsI*, que codifica un regulador transcripcional, está precedido por una caja de nodulación. La secreción de proteínas a través del T3SS es dependiente de la presencia de NodD y de TtsI. NodD, en presencia de flavonoides, activa la transcripción de *ttsI*, cuyo producto se une a una secuencia conservada (*tts box* o TB) en las regiones promotoras de los genes que regula, induciendo la expresión de los genes de síntesis y ensamblaje de la maquinaria de traslocación, así como de la producción de las Nops (López-Baena *et al.*, 2008).

10. Movilidad.

Las bacterias colonizan superficies en muchos ambientes diferentes e interactúan dinámicamente con la superficie para detectar señales ambientales y la presencia de otras bacterias (Fuqua *et al.*, 2001). Dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de la superficie, las bacterias pueden permanecer sésiles, moverse para colonizar áreas más grandes, invadir el tejido del hospedador o formar cuerpos fructíferos para producir esporas y esperar condiciones más favorables. Como grupo, las bacterias que viven en colonias tienen más ventajas que aquellas que viven individualmente: pueden optimizar (a) el crecimiento y la supervivencia al tener distintos tipos de células ejerciendo funciones especializadas, (b) el acceso a nutrientes, y (c) mecanismos de defensa para la protección contra la desecación (Harshey, 2003).

Hace casi medio siglo, Hernrichsen (Hernrichsen, 1972) estudió la movilidad en superficie de cientos de cepas de 40 especies bacterianas pertenecientes a 18 géneros diferentes. Identificó tipos diferentes de movilidad: *swimming*, *swarming*, *gliding*, *twitching* y *sliding* (Figura 7).

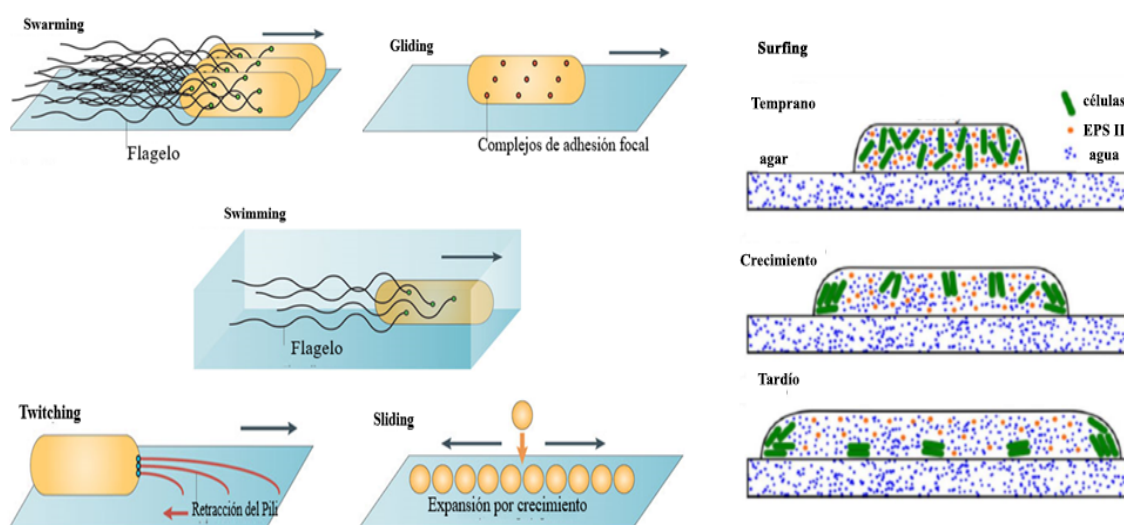


Figura 7. Principales tipos de movildades bacterianas: *swarming*, *swimming*, *twitching*, *gliding*, *sliding* (Figura modificada de Kearns, 2010) y *surfing* (Figura modificada de Dilanji *et al.*, 2014).

El *swimming* es un movimiento dependiente de flagelo, se da en medios acuosos y en superficies que presentan un fluido denso sobre ellas y se caracteriza por un patrón de movimiento bacteriano desorganizado. Cada flagelo está compuesto por un largo filamento helicoidal, una estructura corta curvada conocida como *hook* o codo,

responsable de convertir el movimiento giratorio del eje en helicoidal, y el cuerpo basal que consiste en una vara central y varios anillos (Kearns, 2010).

El *swarming* es un tipo de translocación bacteriana dependiente de flagelo y que se caracteriza por el movimiento rápido y coordinado de toda una población bacteriana sobre una superficie semisólida. Es un movimiento muy extendido entre las bacterias flageladas, sugiriendo que esta forma de translocación desempeña un papel muy importante en la colonización de los microorganismos de los ambientes naturales (Harshey, 1994).

El *sliding* es un movimiento bacteriano pasivo ya que es independiente de apéndices motores y se produce por la expansión de una colonia en crecimiento y la reducción de tensiones superficiales debido a la excreción de agentes surfactantes (Hernrichsen, 1972; Kearns, 2010). Existe una fuerte correlación entre la producción de surfactantes tales como lipopéptidos, lipopolisacáridos y glicolípidos, y el movimiento *sliding* (Matsuyama *et al.*, 1995; Recht *et al.*, 2000; Brown y Hase, 2001; Harshey, 2003).

Por otro lado, el *twitching* es un tipo de movilidad sobre superficie llevado a cabo por células individuales y que tiene lugar debido a la extensión y retracción de *pili* tipo IV (Mattick, 2002; Kearns, 2010). La movilidad tipo *twitching* puede promover el movimiento de las colonias hacia el ambiente que las rodea en condiciones ricas en nutrientes, así como unir las células formando cuerpos fructíferos cuando hay escasez de estos (Harshey, 2003).

El *gliding* no requiere la presencia de flagelos o *pili* pero implica la participación de complejos de adhesión focal; los cuales anclan la bacteria al sustrato y actúan como motor que mueve el cuerpo bacteriano sobre el punto de anclaje (Kearns, 2010).

Recientemente se ha descrito un nuevo tipo de movilidad en superficie en *S. meliloti*, la movilidad tipo *surfing*, que se caracteriza por una acumulación de EPS en la colonia que provoca entrada de agua desde el medio externo y el consiguiente deslizamiento de la colonia bacteriana sobre la superficie del agua (**Figura 7**) (Dilanji *et al.*, 2014).

10.1. El flagelo

El flagelo bacteriano es “un ejemplo de ingeniería a nanoescala que las bacterias han estado perfeccionando durante miles de millones de años” (Erhardt *et al.*, 2010). Esta estructura supramolecular se compone de aproximadamente 25 subunidades proteicas diferentes y se autoensambla alcanzando longitudes de hasta 20 μm , lo que supone varias veces la longitud de la célula (Chevance y Hughes, 2008). El flagelo permite a las

bacterias colonizar superficies, buscar alimentos y evitar sustancias nocivas en su entorno (Kearns, 2010). Para que su ensamblaje tenga lugar de manera adecuada, se han desarrollado numerosos mecanismos reguladores.

El flagelo se divide en tres partes: el cuerpo basal (motor rotativo), el gancho o codo (junta universal) y el filamento (hélice helicoidal) (Terashima *et al.*, 2008) (**Figura 8**).

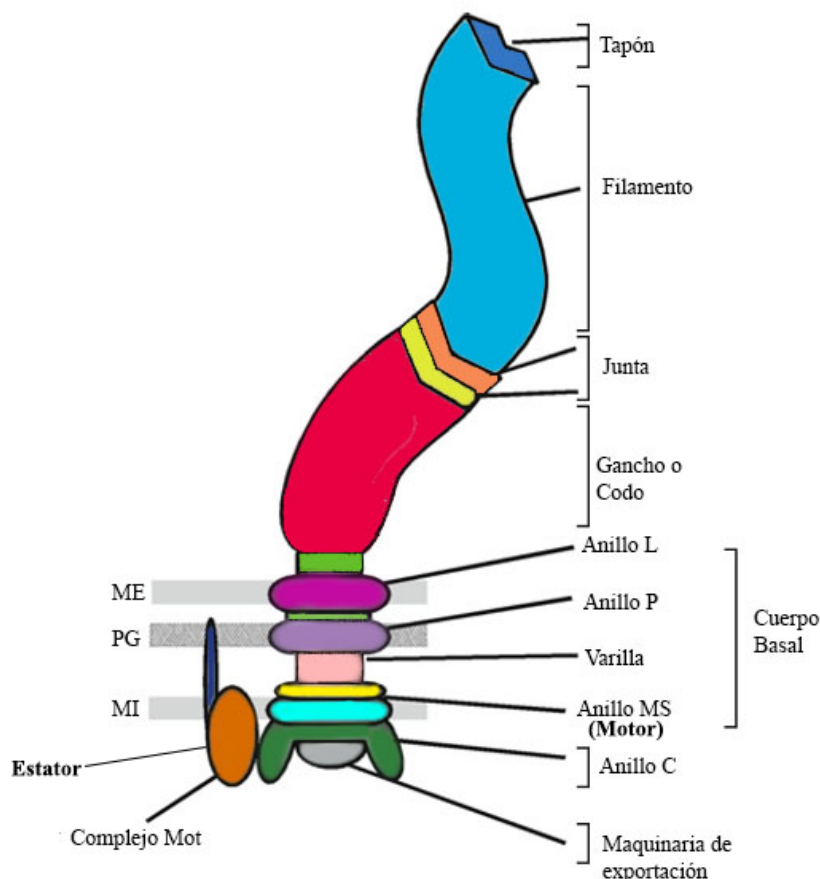


Figura 8. Estructura del flagelo de una bacteria Gram-negativa. ME, membrana externa. PG, Peptidoglicano. MI, membrana interna. Figura adaptada de Terashima *et al.*, 2008.

La parte más larga del flagelo es el filamento, una estructura cuya forma puede variar entre diferentes formas helicoidales (Asakura, 1970). Cuando la célula nada, el filamento flagelar actúa como un tornillo helicoidal para convertir el movimiento giratorio del motor en empuje (Berg y Anderson, 1973). En muchas bacterias, el filamento está constituido por miles de subunidades idénticas de una única proteína, la flagelina. En *E. coli* y *Salmonella* hay hasta 30.000 copias de flagelina, FliC (Minamino y Namba, 2004). Sin embargo, algunas especies bacterianas tienen varias flagelinas distintas formando el filamento del flagelo (McCarter, 2001; Nakamura y Minamino, 2019). En *S. meliloti* y *S. fredii* hay 4 tipos de flagelinas (FlaA, FlaB, FlaC y FlaD), en *Rhizobium lupini*

encontramos 3 (FlaA, FlaB y FlaD) (Scharf *et al.*, 2001) y *R. leguminosarum* tiene 3 flagelinas principales (FlaA, FlaB y FlaC) y 4 secundarias (FlaD, FlaE, FlaH y FlaG) (Tambalo *et al.*, 2010). Las subunidades de flagelina se autoensamblan para formar una estructura tubular concéntrica hueca que consiste en 11 protofilamentos dispuestos en paralelo al eje del filamento (Mimori *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1995). La formación de la estructura helicoidal se logra mediante una mezcla de los protofilamentos de dos conformaciones distintas, tipo R y tipo L, en función de la orientación de la hélice hacia la derecha o izquierda, respectivamente (Asakura, 1970; Calladine, 1978).

La base del filamento se conecta con el gancho o codo, una estructura flexible tubular que funciona como una junta para transmitir la torsión producida por el motor al filamento. En *Salmonella* el gancho se compone de aproximadamente 120 copias de una sola proteína, FlgE (Hirano *et al.*, 1994). Entre el gancho y el filamento del flagelo se disponen dos proteínas, HAP1 y HAP3 (*hook-associated proteins*, HAPs; FlgK y FlgL respectivamente en *Salmonella*), responsables de la unión de ambas estructuras (Homma y Iino, 1985; Ikeda *et al.*, 1985). La longitud del gancho también es importante para la máxima estabilidad del flagelo. Los ganchos más cortos son demasiado rígidos para funcionar como unión entre éstos y los filamentos, mientras que los ganchos más largos resultan inestables (Spöring *et al.*, 2018). La longitud del gancho está controlada por la proteína FliK, que se secreta a través del T3SS flagelar durante el ensamblaje del mismo (Minamino, 2018).

En el extremo proximal del gancho se encuentra el cuerpo basal formado por múltiples estructuras de anillo denominados anillo L, anillo P, anillo MS y anillo C (Minamino *et al.*, 2008). Los anillos L, formado por la lipoproteína FlgH, y P, formado por la proteína periplásmica FlgI, se encuentran en la membrana externa y la capa de peptidoglicano (PG), respectivamente, y juntos actúan como soporte para la varilla. En bacterias Gram-positivas este cuerpo basal está constituido únicamente por el anillo MS, bien conservado entre las distintas especies bacterianas, mientras que el anillo LP está ausente (Kobayashi *et al.*, 2003; Minamino e Imada, 2015; Terashima *et al.*, 2017), ya que las bacterias Gram-positivas no tienen membrana externa, pero sí una capa gruesa de peptidoglicano (Terashima *et al.*, 2008). En el lado citoplasmático de la membrana, por debajo del anillo M, se encuentra el anillo C que no sólo actúa como parte central del rotor flagelar para generar la torsión, sino también como un dispositivo estructural para cambiar la dirección de rotación del motor, así como sitio de afinidad para la secreción y el ensamblaje de otras estructuras flagelares (Kubori *et al.*, 1992; Minamino *et al.*, 2008; Cohen y Hughes,

2014). Este anillo está compuesto principalmente por las proteínas FliM y FliN (Thomas *et al.*, 2006; Terashima *et al.*, 2008), las cuales, junto con FliG que se encuentra debajo del anillo MS, forman el denominado complejo interruptor. Las mutaciones en cada una de estas tres proteínas causan defectos en el cambio de dirección de rotación del motor (Yamaguchi *et al.*, 1986a) por lo que están implicadas en el cambio de sentido del giro del mismo: permiten que el motor pueda girar en sentido de las agujas del reloj y en el sentido contrario.

Para que el motor flagelar bacteriano funcione se requiere energía, la cual proviene del gradiente electroquímico transmembrana de protones, es decir, la fuerza motriz de protones, la cual hace girar el filamento flagelar para generar el empuje necesario para impulsar el cuerpo celular (Nakamura y Minamino, 2019). El motor consta de dos partes: la parte giratoria o rotor, que está conectada al gancho y al filamento, y la parte no giratoria o estator, que es responsable de la conversión de la energía (Terashima *et al.*, 2008) (**Figura 8**).

En *Salmonella* la síntesis del flagelo comienza con el ensamblaje del cuerpo basal (Macnab, 2003). Primero se ensambla el anillo MS dentro de la membrana citoplasmática y después el anillo C (Kubori *et al.*, 1992; Cohen y Hughes, 2014). El T3SS específico de flagelo se ensambla a la membrana interna dentro de los anillos MS y C. Este sistema secreta las subunidades flagelares desde el citoplasma para que se ensamblen a la punta del flagelo en crecimiento (Cohen y Hughes, 2014). La varilla se ensambla inicialmente en una estructura de varilla proximal que se encuentra entre el anillo MS y la pared celular y está compuesta por FliE y aproximadamente 6 subunidades de FlgB, FlgC y FlgF (Jones *et al.*, 1990b). FliE podría actuar como un adaptador que une la varilla proximal al anillo MS, con FlgB, FlgC y FlgF ensamblados uno encima del otro hasta alcanzar la pared celular (Jones y Macnab, 1990a; Homma *et al.*, 1990). Para que el ensamblaje de la varilla se dirija a la membrana externa se necesita hacer un orificio en la pared celular, papel que desempeña FlgJ.

La proteína FlgJ distribuida en β - y γ -proteobacterias, como *S. enterica*, *Vibrio* spp., *Sphingomonas* sp. y *Pseudomonas* spp., es bifuncional: está constituida por un dominio N-terminal de andamiaje necesario para la polimerización de la varilla distal y un dominio C-terminal con actividad lítica, requerido para formar el orificio en la capa de peptidoglicano (Erhardt *et al.*, 2011; Herlihey *et al.*, 2014), tras lo cual se segregan unas 26 subunidades de la proteína de la varilla distal, FlgG, que se ensamblan bajo FlgJ, y acercan a ésta a la membrana externa (Jones y Macnab, 1990; Chevance *et al.*, 2007;

Cohen y Hughes, 2014). FlgJ es la primera autolisina caracterizada en bacterias Gram-negativas que tiene actividad β -N-acetilglucosaminidasa, rompiendo el enlace glucosídico β -1,4 entre los residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y N-acetilmurámico (MurNAc) del peptidoglicano de la pared celular bacteriana (Herlihey *et al.*, 2014; Zaloba *et al.*, 2016). En α -proteobacterias como *Rhodobacter sphaeroides*, FlgJ carece de dominio C-terminal con actividad lítica, actuando únicamente como proteína de andamiaje para la varilla flagelar (González-Predajo *et al.*, 2002). Para llevar a cabo la lisis de la capa de peptidoglicano en esta bacteria interviene SltF (*soluble lytic transglycosylase*), proteína con actividad lítica que es exportada al espacio periplásmico donde interacciona con FlgJ para abrir el orificio en la capa de peptidoglicano de la pared celular (de la Mora *et al.*, 2007; García-Ramos *et al.*, 2018).

Tras la polimerización de la varilla distal, se forma otro orificio en la membrana externa para la construcción del gancho y del filamento extracelulares en la superficie de la célula. Para que esto suceda, FlgA, FlgH y FlgI se secretan a través del T2SS Sec al periplasma. FlgI forma el anillo P, cuyo ensamblaje es facilitado por FlgA, y FlgH forma el anillo L (Cohen y Hughes, 2014). La formación del anillo PL y de los poros en la membrana externa se continúa con la polimerización del gancho. Esto requiere que FlgD reemplace a FlgJ para que el gancho (FlgE) se polimerice desde la punta de la varilla a la superficie de la célula. La polimerización del gancho termina por la acción de FliK (Erhardt *et al.*, 2010) que se secreta durante la polimerización del gancho, y cuando este alcanza una longitud mínima de aproximadamente 40 nm, el extremo C-terminal de FliK interacciona con un componente del T3SS flagelar, FlhB, lo que resulta en un cambio conformacional de éste (Minamino *et al.*, 2006; Minamino *et al.*, 2009). FlhB especifica qué sustratos se secretan a través del sistema de secreción. Antes de la interacción con FliK, FlhB permite la secreción de las subunidades proteicas de la varilla y del gancho. Las HAPs (*hook-associated proteins*), FlgK, FlgL y FliD, y la proteína reguladora FlgM se secretan a continuación. El ensamblaje de las HAPs provoca la liberación de FlgD. Finalmente se polimeriza el filamento que alcanza longitudes de hasta aproximadamente 15 μ m (Cohen y Hughes, 2014) (**Figura 9**).

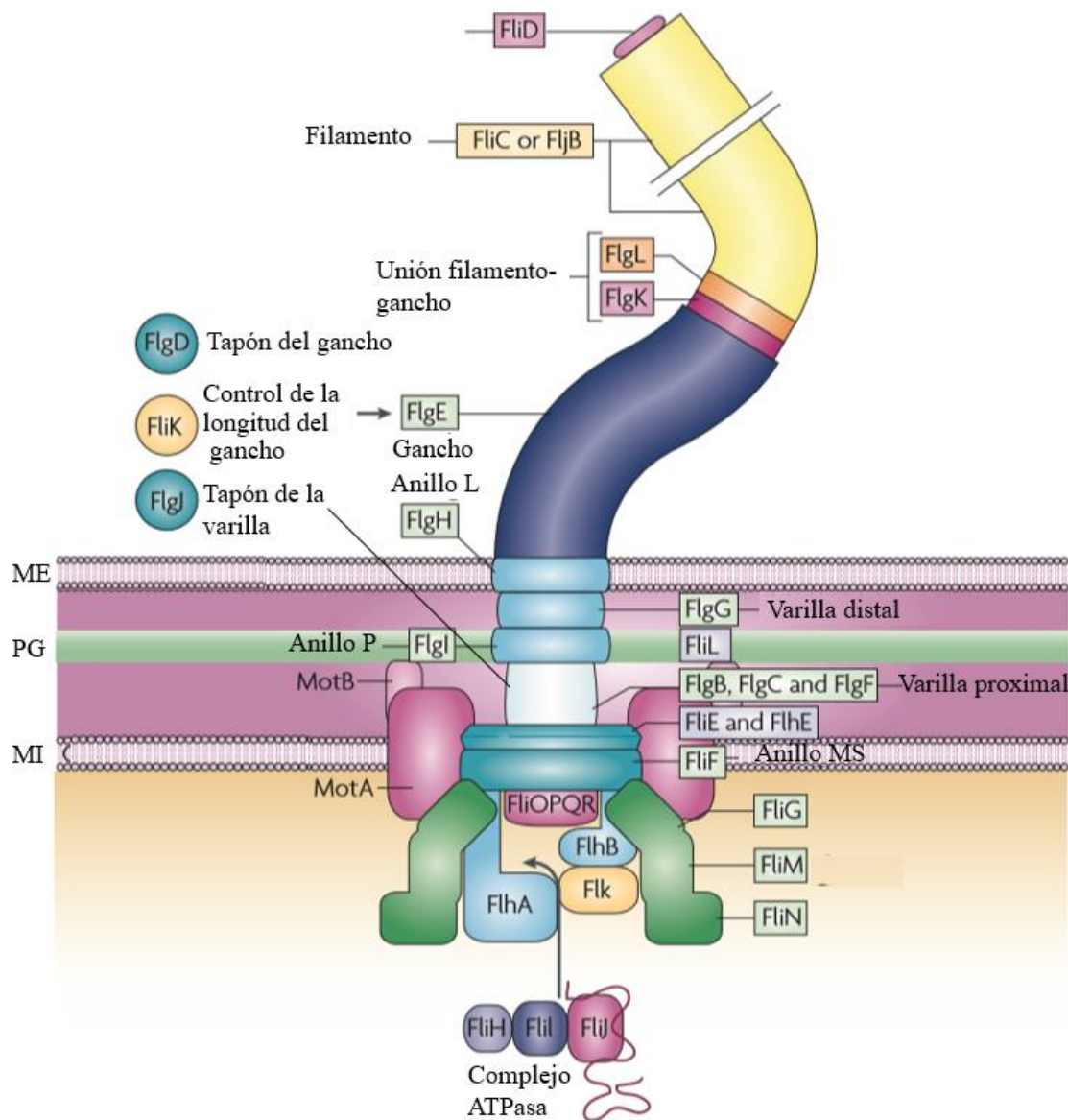


Figura 9. Componentes del flagelo de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. Los componentes citoplasmáticos solubles incluyen el complejo ATPasa (FliH–FliI–FliJ). La proteína del filamento consiste en FliC o FljB, que se transcriben alternativamente. El tapón de la varilla (FlgJ) y el tapón del gancho (FlgD) se asocian transitoriamente con el flagelo durante la polimerización de la varilla y el gancho, respectivamente. Figura adaptada de Chevance y Hughes, 2008.

OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación lleva años estudiando la simbiosis rizobio-leguminosa, centrándose más concretamente en la bacteria *Sinorhizobium fredii* HH103, simbiote de amplio rango de hospedador que incluye a la soja, de gran interés agronómico, y leguminosas formadoras de distintos tipos de nódulos. Recientemente hemos iniciado estudios transcriptómicos que revelan que la genisteína, flavonoide inductor de los genes de nodulación en HH103, afecta la expresión de un número considerable de genes muy probablemente implicados en simbiosis, muchos de los cuales no se han caracterizado en rizobios. Algunos de estos genes se localizan en el cromosoma o en plásmidos diferentes del simbiótico; otros están situados en el pSym, están precedidos por *nod boxes*, y estudios preliminares (*qPCR*) han revelado que su expresión depende de NodD1. Los genes identificados se dividen en tres grupos: dependientes de *nod boxes* (regulados por NodD1), dependientes de *tts boxes* (regulados por TtsI) y aquellos de los que se desconoce cómo son regulados pero que en su mayoría dependen de NodD1 (donde se incluyen aquellos precedidos por *SyrM boxes* y por lo tanto, cuya expresión se controla por SyrM).

En base a estos antecedentes, en esta Tesis se pretende continuar con la caracterización del complejo regulón génico dependiente de flavonoides en *S. fredii* HH103, integrando el papel de los diversos reguladores que participan en este regulón, así como iniciar el estudio de algunos genes de *S. fredii* HH103 regulados por flavonoide. Por tanto, estos genes pueden estar implicados en su capacidad simbiótica con diversas leguminosas. Para ello se proponen los siguientes objetivos:

I) Estudiar la relevancia simbiótica de los genes psfHH103d_208 y psfHH103d_448 en la simbiosis de *S. fredii* HH103 con *Glycine max*.

II) Caracterizar los genes psfHH103d_373, psfHH103d_371.5 y psfHH103d_370 y estudiar su implicación en la simbiosis de *S. fredii* HH103 con diversas leguminosas.

III) Caracterizar los genes *flgJ*, SFHH103_00347 y SFHH103_00348 y estudiar su implicación en la simbiosis de *S. fredii* HH103 con diversas leguminosas.

IV) Continuar con la caracterización del circuito regulador del regulón *nod*, integrando el papel de NodD1, NodD2, TtsI, NolR y SyrM.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y Métodos relacionados con bacterias.

1.1. Bacterias, plásmidos y agentes selectivos e identificativos.

1.1.1. Bacterias y plásmidos.

Las estirpes bacterianas y plásmidos utilizados en esta Tesis se recogen en la **Tabla**

2.

Tabla 2. Bacterias y plásmidos utilizados en esta Tesis.

<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103		
Estirpe	Características relevantes	Referencia
SVQ269	Derivado Rif ^R de HH103 (estirpe silvestre)	Madinabeitia <i>et al.</i> , 2002
Capítulo 1		
SVQ776	SVQ269 mutado en el gen psfHH103d_208 por integración por simple recombinación del plásmido pMUS1368, Rif ^R Km ^R Sp ^R	Esta Tesis
SVQ777	SVQ269 mutado en el gen psfHH103d_448 por integración por simple recombinación de pMUS1369, Rif ^R Km ^R Spc ^R	Esta Tesis
Capítulo 2		
SVQ764	SVQ269 mutado en el gen <i>shc</i> (psfHH103d_370) por integración por simple recombinación de pMUS1349, Rif ^R Km ^R Sp ^R	Esta Tesis
SVQ765	SVQ269 mutado en el gen psfHH103d_373 por integración por simple recombinación de pMUS1354, Rif ^R Km ^R Sp ^R	Esta Tesis
SVQ766	SVQ269 mutado en el gen psfHH103d_371.5 por integración por simple recombinación de pMUS1366, Rif ^R Km ^R Sp ^R	Esta Tesis
Capítulo 3		
SVQ318	SVQ269 <i>nodD1::Ω</i> , Rif ^R Sp ^R	Vinardell <i>et al.</i> , 2004b
SVQ515	SVQ269 <i>nodD2::Ω</i> , Rif ^R Sp ^R	López-Baena <i>et al.</i> , 2008
SVQ519	SVQ269 <i>ttsI::Ω</i> , Rif ^R Sp ^R	López-Baena <i>et al.</i> , 2008
SVQ557	SVQ269 <i>nolR::Ω</i> , Rif ^R Sp ^R	López-Baena, 2008

SVQ724	SVQ269 con el gen <i>syrM</i> delecionado (Δ <i>syrM</i>), Rif ^R	Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2019
SVQ768	SVQ269 con el gen SFHH103_00347 delecionado (Δ 347), Rif ^R	Esta Tesis
SVQ768C	SVQ768 complementado en <i>cis</i> por integración de pMUS1411, derivado de pK18 <i>mob</i> que porta una copia silvestre del gen SFHH103_00347, Rif ^R Km ^R	Esta Tesis
SVQ775	SVQ269 con el gen SFHH103_00348 delecionado (Δ 348), Rif ^R	Esta Tesis
SVQ775C	SVQ775 complementado en <i>cis</i> por integración de pMUS1411, derivado de pK18 <i>mob</i> que porta una copia silvestre del gen SFHH103_00348, Rif ^R Km ^R	Esta Tesis
SVQ801	SVQ269 <i>flgJ::lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Esta Tesis
SVQ807	SVQ269 con el gen <i>flgJ</i> delecionado (Δ <i>flgJ</i>), Rif ^R	Esta Tesis

Capítulo 4

SVQ116	SVQ269 <i>nodA::Tn5</i> -B20	Vinardell <i>et al.</i> , 2004b
SVQ533	SVQ269 <i>ttsI::</i> Ω , Rif ^R Sp ^R	López-Baena <i>et al.</i> , 2008
SVQ534	SVQ269 <i>ttsI::lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	López-Baena <i>et al.</i> , 2008
SVQ548	SVQ269 <i>nolR::lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2016b
SVQ549	SVQ269 <i>nodD1::</i> Ω <i>nolR::lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Sp ^R Gm ^R	López-Baena, 2008
SVQ550	SVQ269 <i>ttsI::</i> Ω <i>nolR::lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Sp ^R Gm ^R	López-Baena, 2008
SVQ551	SVQ269 <i>nodD2::</i> Ω <i>nolR::lacZ</i> -Gm ^R , Rif ^R Sp ^R Gm ^R	López-Baena, 2008
SVQ555	SVQ269 <i>nodD1::</i> Ω <i>nodD2::lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Sp ^R Gm ^R	Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2019
SVQ556	SVQ269 <i>ttsI::</i> Ω <i>nodD2::lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Sp ^R Gm ^R	López-Baena, 2008
SVQ727	SVQ269 <i>syrM::lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2020
SVQ770	SVQ269 Δ <i>syrM</i> <i>nodD2::lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Esta Tesis
SVQ786	SVQ269 <i>nodD1::lacZ</i> Δ p-Gm ^R , Rif ^R Gm ^R	Esta Tesis

SVQ787	SVQ269 <i>nodD2::lacZΔp-Gm^R, Rif^R Gm^R</i>	Esta Tesis
SVQ788	SVQ269 <i>nolR::Ω nodD1::lacZΔp-Gm^R, Rif^R Spc^R Gm^R</i>	Esta Tesis
SVQ789	SVQ269 <i>ΔsyrM nolR::lacZΔp-Gm^R, Rif^R Gm^R</i>	Esta Tesis
SVQ790	SVQ269 <i>nodD2::Ω nodD1::lacZΔp-Gm^R, Rif^R Sp^R Gm^R</i>	Esta Tesis
SVQ791	SVQ269 <i>nolR::Ω nodD2::lacZΔp-Gm^R, Rif^R Sp^R Gm^R</i>	Esta Tesis
SVQ811	SVQ269 <i>ΔsyrM nodD1::lacZΔp-Gm^R, Rif^R Gm^R</i>	Esta Tesis
SVQ813	SVQ269 <i>nodA::Tn5-B20 nodD2::Ω, Rif^R Sp^R Km^R</i>	Esta Tesis
SVQ815	SVQ269 <i>nodA::Tn5-B20 nolR::Ω, Rif^R Sp^R Km^R</i>	Esta Tesis
SVQ817	SVQ269 <i>ttsI::Ω nodD1::lacZΔp-Gm^R, Rif^R Sp^R Gm^R</i>	Esta Tesis

Escherichia coli

Estirpe	Características relevantes	Referencia
DH5α	<i>SupE44, ΔlacU169, 5hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1, Nal^R</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
BTH101	<i>cya-99, araD139, galE15, galK16, rpsL1 (Str^R), hsdR2, mcrA1, mcrB1</i>	Euromedex, TwoHybrid (BACTH) System Kit
S17-1	<i>pro, res⁻ hsdR17 (rK⁻ mK⁺) recA⁻ with an integrated RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7, Tp^R</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983

Plásmidos

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pRK2013	Plásmido coadyuvante, Km ^R	Figurski y Helinski, 1979
pAB2001	Plásmido que contiene el casete <i>lacZΔp-Gm^R, Gm^R</i>	Becker <i>et al.</i> , 1995c
pK18 <i>mob</i>	Vector de clonación (suicida en los rizobios), Km ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pK18 <i>mobsac</i>	Vector de clonación que contiene los genes <i>sacBR</i> de <i>Bacillus subtilis</i> , que confieren	Schäfer <i>et al.</i> , 1994

	sensibilidad a la sacarosa en bacterias Gram-negativas. Suicida en los rizobios, Km ^R	
pMP220	Vector de clonación para fusiones transcripcionales con el gen <i>lacZ</i> carente de promotor, Tc ^R	Spaink <i>et al.</i> , 1987a
Stm9689 pVO155- <i>nptII</i> -GFP	Plásmido derivado de pUC19 que contiene el gen <i>gus</i> sin promotor y, <i>gfp</i> con expresión constitutiva, Km ^R Sp ^R	Oke y Long, 1999
pSKDSRED	Plásmido pFAJ1708 que contiene el gen <i>dsred.t4</i> , Tc ^R	Kelly <i>et al.</i> , 2013
pKT25	Vector con sitio de clonación múltiple en el extremo 3' del fragmento T25 de adenilato ciclasa, de bajo número de copias, Km ^R	Euromedex, TwoHybrid (BACTH) System Kit
pKNT25	Vector con sitio de clonaje múltiple en el extremo 5' del fragmento T25 de adenilato ciclasa, de bajo número de copias, Km ^R	Euromedex, TwoHybrid (BACTH) System Kit
pUT18C	Vector con sitio de clonaje múltiple en el extremo 3' del fragmento T18 de adenilato ciclasa, de alto número de copias, Ap ^R .	Euromedex, TwoHybrid (BACTH) System Kit
pUT18	Vector con sitio de clonaje múltiple en el extremo 5' del fragmento T18 de adenilato ciclasa, de alto número de copias, Ap ^R .	Euromedex, TwoHybrid (BACTH) System Kit
pKT25-zip	Vector derivado del pKT25 que contiene la cremallera de leucina GCN4 como proteína de fusión a T25, Km ^R	Euromedex, TwoHybrid (BACTH) System Kit
pUT18C-zip	Vector derivado del pUT18C que contiene la cremallera de leucina GCN4 como proteína de fusión a T18, Ap ^R	Euromedex, TwoHybrid (BACTH) System Kit

Capítulo 1

pMUS1368	Plásmido pVO155 que contiene un fragmento <i>Sali-XbaI</i> de ~0,5 kb del gen psfHH103d_208 de <i>S. fredii</i> HH103, Km ^R Sp ^R	Esta Tesis
pMUS1369	Plásmido pVO-155 que contiene un fragmento <i>Sali-XbaI</i> de ~0,3 kb del gen psfHH103d_448 de <i>S. fredii</i> HH103, Km ^R Sp ^R	Esta Tesis

Capítulo 2

pMUS1349	Plásmido pVO155 que contiene un fragmento <i>Sali-XbaI</i> de ~0,4 kb del gen psfHH103d_370 (<i>shc</i>) de <i>S. fredii</i> HH103, Km ^R Sp ^R	Esta Tesis
pMUS1354	Plásmido pVO155 que contiene un	Esta Tesis

fragmento *SalI-XbaI* de ~0,4 kb del gen *psfHH103d_373* de *S. fredii* HH103, Km^R Sp^R

pMUS1366 Plásmido pVO-155 que contiene un fragmento *SalI-XbaI* de ~0,4 kb del gen *psfHH103d_371.5* de *S. fredii* HH103, Km^R Sp^R Esta Tesis

Capítulo 3

pMUS1347 Plásmido pK18*mobsacB* que porta un fragmento *EcoRI-HindIII* de ~1 kb que contiene el gen *SFHH103_00348* delecionado de *S. fredii* HH103, Km^R Esta Tesis

pMUS1348 Plásmido pK18*mobsacB* que porta un fragmento *BamHI-HindIII* de ~1 kb que contiene el gen *SFHH103_00346 (flgJ)* delecionado de *S. fredii* HH103, Km^R Esta Tesis

pMUS1355 Plásmido pK18*mobsacB* que porta un fragmento *XbaI-SphI* de ~1 kb que contiene el gen *SFHH103_00347* delecionado de *S. fredii* HH103, Km^R. Esta Tesis

pMUS1392 Plásmido pMP220 que contiene un fragmento *XbaI-BglII* de ~0,8 kb del promotor del operón *SFHH103_00346-00347-00348* que incluye una *tts box* y una *SyrM box*, Tc^R Esta Tesis

pMUS1393 Plásmido pMP220 que contiene un fragmento *EcoRI-SphI* de ~0,2 kb del promotor del operón *SFHH103_00346-00347-00348* que incluye una *tts box*, Tc^R Esta Tesis

pMUS1408 Plásmido pK18*mob* que porta un fragmento *BamHI-HindIII* de ~1,5 kb que contiene el gen *flgJ* de *S. fredii* HH103, Km^R. Esta Tesis

pMUS1410 pMUS1408 con el casete *lacZΔp-Gm^R* inserto en el punto *PstI* del gen *flgJ*, Km^R Gm^R Esta Tesis

pMUS1411 Plásmido pK18*mob* que contiene el operón *SFHH103_00346-00347-00348* de ~3 kb clonado en los puntos *KpnI-XbaI*, Km^R Esta Tesis

pMUS1421 Plásmido pKNT25 que contiene un fragmento *KpnI-XbaI* de ~0,5 kb del gen *flgJ* de *S. fredii* HH103 para doble híbrido, Km^R Esta Tesis

pMUS1422 Plásmido pKNT25 que contiene un fragmento *KpnI-XbaI* de ~0,4 kb del gen *SFHH103_00347* de *S. fredii* HH103 para doble híbrido, Km^R Esta Tesis

pMUS1423	Plásmido pKNT25 que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~0,6 kb del gen SFHH103_00348 de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Km ^R	Esta Tesis
pMUS1424	Plásmido pUT18 que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~0,5 kb del gen <i>flgJ</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Ap ^R	Esta Tesis
pMUS1425	Plásmido pUT18 que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~0,4 kb del gen SFHH103_00347 de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Ap ^R	Esta Tesis
pMUS1426	Plásmido pUT18C que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~0,5 kb del gen <i>flgJ</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Ap ^R	Esta Tesis
pMUS1427	Plásmido pUT18C que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~0,4 kb del gen SFHH103_00347 de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Ap ^R	Esta Tesis
pMUS1429	Plásmido pUT18C que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~0,6 kb del gen SFHH103_00348 de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Ap ^R	Esta Tesis
pMUS1430	Plásmido pKT25 que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~0,5 kb del gen <i>flgJ</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Km ^R	Esta Tesis
pMUS1431	Plásmido pKT25 que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~0,4 kb del gen SFHH103_00347 de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Km ^R	Esta Tesis
pMUS1432	Plásmido pKT25 que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~0,6 kb del gen SFHH103_00348 de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Km ^R	Esta Tesis
pMUS1445	Plásmido pUT18 que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~0,6 kb del gen SFHH103_00348 de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Ap ^R	Esta Tesis

Capítulo 4

pMUS296	Plásmido pMP92 que contiene un fragmento <i>EcoRV/ApaI</i> de ~1,7 kb con el gen <i>nodD1</i> , Tc ^R	Vinardell <i>et al.</i> , 2004a
---------	---	---------------------------------

pMUS534	Plásmido pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento <i>Hind</i> III de ~6 kb procedente de pMUS462 que porta la fusión <i>nodD1::lacZΔp-Gm^R</i> , Gm ^R	Vinardell <i>et al.</i> , 2004a
pMUS675	Plásmido pMP92 que contiene un fragmento <i>Eco</i> RI de ~2,5 kb con el gen <i>nolR</i> , Tc ^R	Vinardell <i>et al.</i> , 2004b
pMUS689	Derivado de pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento <i>Eco</i> RI de ~3,4 kb procedente de pMUS686 que porta la fusión <i>nodD2::Ω</i> , Sp ^R	López-Baena <i>et al.</i> , 2008
pMUS692	Plásmido pK18 <i>mob</i> que porta la fusión <i>nolR::Ω</i> , Sp ^R	Vinardell, J.M.
pMUS741	Plásmido pMP92 que contiene un fragmento <i>Eco</i> RI con el gen <i>ttsI</i> , Tc ^R	López-Baena <i>et al.</i> , 2008
pMUS746	Plásmido pMP92 que contiene un fragmento <i>Eco</i> RI de ~1,4 kb con el gen <i>nodD2</i> , Tc ^R	López-Baena <i>et al.</i> , 2008
pMUS789	Plásmido pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento procedente de pMUS788 que porta la fusión <i>nodD2:: lacZΔp-Gm^R</i> , Gm ^R	Acosta-Jurado, S.
pMUS859	Plásmido pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento procedente de pMUS857 que porta la fusión <i>nolR:: lacZΔp-Gm^R</i> , Gm ^R	Acosta-Jurado, S.
pMUS1230	Plásmido pK18 <i>mob</i> que contiene un fragmento <i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI de ~2 kb del gen <i>syrM</i> , Km ^R	Acosta-Jurado <i>et al.</i> , 2020
pMUS1449	Plásmido pKT25 que contiene un fragmento <i>Kpn</i> I- <i>Xba</i> I de ~1 kb del gen <i>nodD1</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Km ^R	Esta Tesis
pMUS1450	Plásmido pKNT25 que contiene un fragmento <i>Kpn</i> I- <i>Xba</i> I de ~1 kb del gen <i>nodD1</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Km ^R	Esta Tesis
pMUS1451	Plásmido pUT18C que contiene un fragmento <i>Kpn</i> I- <i>Xba</i> I de ~1 kb del gen <i>nodD1</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Ap ^R	Esta Tesis
pMUS1452	Plásmido pUT18 que contiene un fragmento <i>Kpn</i> I- <i>Xba</i> I de ~1 kb del gen <i>nodD2</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Ap ^R	Esta Tesis
pMUS1453	Plásmido pUT18C que contiene un fragmento <i>Kpn</i> I- <i>Xba</i> I de ~1 kb del gen <i>nodD2</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Ap ^R	Esta Tesis
pMUS1454	Plásmido pUT18 que contiene un fragmento <i>Kpn</i> I- <i>Xba</i> I de ~1 kb del gen <i>nodD1</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Ap ^R	Esta Tesis

pMUS1455	Plásmido pKT25 que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~1 kb del gen <i>nodD2</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Km ^R	Esta Tesis
pMUS1457	Plásmido pKNT25 que contiene un fragmento <i>KpnI-XbaI</i> de ~1 kb del gen <i>nodD2</i> de <i>S. fredii</i> HH103 para doble híbrido, Km ^R	Esta Tesis

Ap: ampicilina, Gm: gentamicina, Km: kanamicina, Nal: ácido nalidíxico, Sp: espectinomocina, Str: estreptomocina, Tc: tetraciclina, Rif: rifampicina.

1.1.2. Agentes selectivos e identificativos.

Para la selección e identificación de las diferentes estirpes bacterianas y plásmidos se utilizaron los siguientes agentes selectivos, suministrados por Sigma (EEUU), a las concentraciones indicadas:

Agente selectivo	Solución stock (mg mL ⁻¹)	<i>S. fredii</i> (µg mL ⁻¹)	<i>E. coli</i> (µg mL ⁻¹)
Ampicilina (Ap)	100	-	100
Espectinomocina (Sp)	50	50	100
Gentamicina (Gm)	50	5-50	10
Kanamicina (Km)	30	60	30
Ácido nalidíxico (Nal)	10	10	20
Rifampicina (Rif)	25	50	25
Tetraciclina (Tc)	10	1-2	10
X-gal *	20	40	40

*(5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido)

La rifampicina se disolvió en metanol, la tetraciclina en etanol al 70% y el ácido nalidíxico en una solución de NaOH 0,1 M. Los demás antibióticos se disolvieron en agua destilada. El X-gal, suministrado por Roche (Suiza), se disolvió en N, N-dimetilformamida (40 mg mL⁻¹). La temperatura de almacenamiento de los antibióticos y del X-gal fue de -20°C. La sacarosa se usó a una concentración final del 12,5% (m/v).

1.1.3. Flavonoides.

La isoflavona genistéina, suministrada por Sigma Aldrich o Santa Cruz Biotechnology (EEUU), se disolvió a una concentración de 1 mg mL⁻¹ en etanol absoluto y se añadió a los cultivos para alcanzar una concentración final de 1 µg mL⁻¹ (= 3,7 µM). La temperatura de almacenamiento fue de -20°C.

1.2. Medios de cultivo.

1.2.1. Medios de cultivo para *Sinorhizobium*.

Las estirpes de *Sinorhizobium* se cultivaron en los medios que se detallan a continuación. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 r.p.m. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g L⁻¹ de agar. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 28°C.

Medio TY (Behringer, 1974)

Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,87 g (sólido) o 0,46 g (líquido)
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

Medio YM (Vincent, 1970)

K ₂ HPO ₄	500 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	200 mg
NaCl	100 mg
Extracto de levadura	400 mg
Manitol	10 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

Medio Mínimo (MM)# (Behringer, 1974)

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
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

#Para los experimentos de movilidad en superficie, el manitol se sustituyó por glicerol como fuente de carbono y el agar se sustituyó por agarosa como agente gelificante.

Solución de vitaminas* (1000X)

Biotina	0,02 g
Tiamina	0,01 g
Pantotenato sódico	0,01 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 100 mL

Se esterilizó por filtración y se adicionó 1 mL por litro de MM ya estéril.

Medio MGM (O'Toole y Kolter, 1998)

Base	
MOPS	10,46 g
Manitol	10,02 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L
Glutamato sódico*	10 mL
MgSO ₄ 7H ₂ O*	10 mL
CaCl ₂ 2H ₂ O*	1 mL
K ₂ HPO ₄ *	1 mL
KH ₂ PO ₄ *	0,1 mL
Biotina*	0,1 mL

La base se preparó independientemente de las soluciones, se le ajustó el pH a 6,8-7,0 y se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

Soluciones*

Glutamato sódico (100X)	35,55 g	100 mL
MgSO ₄ 7H ₂ O (100X)	2,46 g	
CaCl ₂ 2H ₂ O (1000X)	1,83 g	
Biotina (1000X)	0,048 g	50 mL
K ₂ HPO ₄ (10000X)	4,35 g	
KH ₂ PO ₄ (10000X)	3,40 g	

Las soluciones se esterilizaron por filtración y se adicionaron los volúmenes correspondientes por litro de base de MGM ya estéril.

Medio Bromfield (Sourjik y Schmitt, 1996)

Extracto de levadura	0,4 g
Triptona	0,1g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,1g
Agar bacteriológico	3 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

1.2.2. Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

Para cultivar las estirpes de *E. coli* se se cultivaron en los medios que se detallan a continuación. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 r.p.m. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g L⁻¹ de agar. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 37°C.

LB (Maniatis *et al.*, 1982)

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

Medio Agar McConkey (McConkey, 1900)

Hidrolizado pancreático de gelatina	17 g
Hidrolizado péptico de tejidos animales	1,5 g
Triptona	1,5 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	1,5 g
NaCl	5 g
Rojo neutro	0,03 g
Cristal violeta	0,001 g
Agar bacteriológico	13,5 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 7,0-7,1 y el medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

1.2.3. Solución de conservación de bacterias.

Para conservar las estirpes bacterianas durante largos periodos de tiempo se congelaron a -80°C utilizando una solución de congelación. Tras cultivar las bacterias en los medios apropiados, la biomasa procedente de 8 mL de cultivo se resuspendió en 2 mL de una solución compuesta de peptona al 0,5% (m/v) y de glicerol al 15% (v/v) previamente esterilizada en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C). Las bacterias así preparadas se conservaron a -80°C.

1.3. Medidas de pH y espectrometría.

El pH de las soluciones se midió con un pH-metro modelo micropH 2001 (Crison, España). Para realizar las medidas espectrofotométricas se empleó el espectrofotómetro Thermofisher Scientific GENESIS 20 y el lector de placas Synergy HT (BioTek, USA).

1.4. Estudio de los polisacáridos superficiales de la bacteria *S. fredii* HH103.**1.4.1. Estudio del lipopolisacárido (LPS).**

Obtención de muestras enriquecidas en LPS a partir de cultivos celulares.

Se llevó a cabo el siguiente procedimiento para su obtención:

- Siembra y cultivo de las estirpes en placas de TY con los antibióticos adecuados durante 4 días a 28°C.
- Recolectar y resuspender una pequeña cantidad de biomasa (aproximadamente 40-60 mg) en 1 mL de NaCl al 0,9% (m/v).
- Centrifugar 5 minutos a 6.200 g y descartar el sobrenadante.
- Lavar tres veces más con NaCl al 0,9% (m/v) e intentar eliminar el máximo posible de sobrenadante en el último lavado.

- Agregar 125 μL de tampón 1 a cada muestra, agitar con vórtex y hervir durante 6 minutos.
- Añadir 875 μL de tampón 2, 3 μL de solución de ARNasa y 10 μL de solución de ADNasa a cada muestra. Incubar durante 4 ó 5 horas a 37°C.
- Agregar 15 μL de solución de proteinasa K, mezclar con vórtex e incubar durante 12-15 horas a 37°C.
- Añadir de nuevo 15 μL de solución de proteinasa K e incubar durante 24 horas a 37°C.
- Transferir 350 μL de cada muestra a un nuevo vial *ependorf* (la fracción sobrante se almacena a -20°C).
- Añadir 1 volumen de tampón de resuspensión, agitar manualmente y hervir durante 6 minutos.
- Centrifugar las muestras durante 7 minutos a 13.8000 g y transferir 600 μL del sobrenadante de cada muestra a nuevos viales.
- Las muestras procesadas de este modo se conservan a -20°C hasta su uso en electroforesis.

Soluciones empleadas:

Tampón 1	Tris-HCl 60 mM pH 6,8, EDTA 1 mM, SDS 2% (m/v) en H ₂ Odd.
Tampón 2	Tris-HCl 60 mM pH 6,8, EDTA 1 mM.
Tampón de resuspensión	5,9 mL Tampón 1, 4 mL glicerol puro, 0,8 mL β -mercaptoetanol, 0,05% (v/v) de una solución saturada de azul de bromofenol.
Solución de ADNasa I	ADNasa I 1mg /mL en Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl ₂ 1 mM.
Solución de ARNasa A	ARNasa 10 mg /mL en Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM. Hervir 15 minutos.
Solución de Proteinasa K (PK)	PK 1 mg /mL en H ₂ Odd.

Electroforesis de LPS.

La electroforesis de las muestras de LPS se realizó en geles de poliacrilamida (40% acrilamida:bisacrilamida (37,5:1)) al 15% en cubetas Mini Protean III (Bio-Rad) a 200V durante 10-15 minutos y posteriormente a 175V durante 60 minutos aproximadamente. La realización de los geles se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante de la poliacrilamida (Bio-Rad).

Soluciones empleadas:

Tampón de electroforesis de LPS	Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (m/v). Ajustar el pH a 8,3.
---------------------------------	---

Visualización del LPS.

Para la visualización del LPS se usó la tinción de plata según Kittelberger y Hilbink (1993). Todos los pasos se realizaron en agitación y a temperatura ambiente.

- Mantener el gel en solución de fijación durante un mínimo de 3 horas.
- Cambiar la solución de fijación por la de oxidación y dejar actuar durante 10 minutos.
- Realizar 5 lavados de 5 minutos cada uno con H₂O.
- Incubar en oscuridad con la solución de plata durante 30 minutos.
- Lavar brevemente con H₂O.
- Añadir la solución reveladora y mantener en oscuridad el gel hasta que aparezcan las bandas.
- Parar la reacción lavando abundantemente con H₂O.
- Una vez parada la reacción se puede mantener el gel en H₂O.

Soluciones empleadas:

Solución de Fijación	Etanol 30% (v/v), ácido acético 10% (v/v) en agua destilada.
Solución de Oxidación	Peryodato sódico 0,7% (NaIO ₄) (m/v) en solución de fijación.
Solución de Tinción	Nitrato de plata 0,1% (AgNO ₃) (m/v) en agua destilada.
Solución de Revelado	Carbonato sódico 3% (Na ₂ CO ₃) (m/v), 0,035% de formaldehído al 37% (v/v) en agua destilada.

1.4.2. Estudio del polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS)

Obtención de muestras enriquecidas en KPS a partir de cultivos celulares.

Para ello se realizan los siguientes procedimientos:

- Cultivar las bacterias con los antibióticos correspondientes en TY sólido durante 4 días o en TY líquido durante 2 días a 28°C.
- Resuspender una pequeña cantidad de biomasa (aproximadamente 50 mg del cultivo en sólido), o el pellet de haber centrifugado 3 mL del cultivo líquido, en 1 mL de NaCl al 0,9% (m/v).

- Centrifugar 5 minutos a 7.800 g.
- Lavar tres veces más las células con NaCl al 0,9% (m/v) y eliminar completamente el sobrenadante tras el último lavado.
- Resuspender el pellet mediante pipeta y/o vórtex. En función de la procedencia del cultivo:
 - a. Para los cultivos sólidos: en 500 µL de tampón KPS1X.
 - b. Para los cultivos líquidos: en 250 µL de tampón KPS1X.
- Hervir las muestras 6 minutos a 100°C, agitar en vórtex y dejar enfriar.
- Añadir 3 µL de solución de ARNasa A y 10 µL de solución de ADNasa I a cada vial. Incubar 4-5 horas a 37°C.
- Añadir 15 µL de solución de proteinasa K a cada vial, agitar e incubar 12-15 horas a 37°C.
- Añadir 15 µL de solución de proteinasa K a cada vial e incubar durante 24 horas.
- Centrifugar durante 5 minutos a 16.000 g y traspasar todo el sobrenadante a un nuevo vial.
- Añadir sacarosa 1M y etanol absoluto:
 - a. Para las muestras procedentes de cultivo líquidos: 400 µL del sobrenadante + 680 µL de sacarosa 1M estéril + 120 µL del etanol absoluto.
 - b. Para muestras procedentes de cultivo sólidos: 200 µL del sobrenadante + 340 µL de sacarosa 1M estéril + 60 µL del etanol absoluto.
- Almacenar las muestras a -20°C hasta su uso.

Soluciones empleadas:

Tampón de KPS 1X	Tris-HCl 50 mM pH 8,5, EDTA 13 mM, H ₃ BO ₃ 15 mM.
Solución de ADNasa I	ADNasa I 1 mg /mL de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, MgCl ₂ 1 mM.
Solución de ARNasa A	ARNasa 10 mg /mL de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 15 mM. Hervir 15 minutos.
Solución de Proteinasa K (PK)	PK 1 mg /mL en H ₂ O dd.

Electroforesis de KPS.

La electroforesis de las muestras enriquecidas en KPS se realizó en un gel de poliacrilamida (40% acrilamida:bisacrilamida (37,5:1)) al 18% en tanque Mini Protean III (Bio-Rad) a 200 V durante 70-90 minutos. Para la obtención de los geles se siguen las instrucciones del fabricante de la poliacrilamida (Bio-Rad) añadiendo un 10% de etanol absoluto y usando la solución Tris-HCl pH 8,8 a 1M como tampón. Se añadieron 2 µL de

una solución saturada de azul de bromofenol en agua destilada a cada muestra antes de cargarla en los geles de poliacrilamida. En el caso de este tipo de geles, y a diferencia de los geles de LPS, no se adiciona SDS.

Soluciones empleadas:

Tampón de electroforesis de KPS	Tris 25 mM, glicina 192 mM, etanol absoluto 10% (v/v). Ajustar el pH a 8,3.
---------------------------------	---

Visualización de KPS.

Para la visualización del KPS se usó el siguiente procedimiento. Todos los pasos se realizaron en agitación y a temperatura ambiente:

Introducir el gel durante un mínimo de 30 a 45 minutos en una solución fijadora con azul alciano. Pasado este tiempo se reemplaza la solución por la solución de fijación y se mantiene como mínimo 3 horas. Una vez completada la fijación se realiza la tinción del KPS con el mismo procedimiento seguido en el LPS.

Soluciones empleadas:

Solución de azul alciano	Azul alciano al 0,5% en ácido acético al 2% en H ₂ O. La solución se puede reutilizar varias veces.
--------------------------	--

1.4.3. Estudio del exopolisacárido (EPS).

Visualización de la producción de EPS.

La producción de EPS se analizó de forma visual mediante el crecimiento de las estirpes en placas de YMA o TY. Para ello, se inocularon tubos de YM o TY líquido con las diferentes estirpes, suplementados con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 28°C en agitación durante 48 horas. Posteriormente, los cultivos se reinocularon en tubos de YM o TY líquido y se incubaron en las mismas condiciones hasta una D.O.₆₀₀ de 0,4 aproximadamente. Se colocaron gotas de 20 µl en placas de YMA o TY, suplementadas o no con genisteína, y se incubaron durante 96 horas a 28°C y posteriormente otras 48 horas a temperatura ambiente, para finalmente fotografiarlas.

Estimación de la cantidad de EPS.

El método de la antrona-H₂SO₄ (Abarca-Grau *et al*, 2012), mide el contenido total de azúcar reductor que se encuentra en una muestra. Este método se utilizó para cuantificar la cantidad de equivalentes de glucosa (µg/mL) presentes en el sobrenadante de cultivos líquidos de las bacterias a estudiar. Para ello, se inocularon tubos de YM suplementados

con los antibióticos adecuados de las estirpes a analizar. Una vez crecidos, se reinocularon en matraces de 250 mL con 20 mL de YM líquido, suplementados o no con genisteína, y se incubaron a 28°C durante 96 horas hasta obtener cultivos con una D.O.₆₀₀ de 1,2-1,3. Los cultivos se centrifugaron a 4.700 g durante 20 minutos y la cantidad de carbohidratos total presentes en el sobrenadante se cuantificó mediante el método de antrona-H₂SO₄. Este método se basa en la hidrólisis con ácido sulfúrico en presencia del indicador colorimétrico antrona, que permite la cuantificación midiendo la D.O.₆₂₀. Las cantidades de azúcares se calcularon usando una recta patrón con concentraciones conocidas de glucosa (0 a 100 µg/mL) y normalizando con la D.O.₆₀₀ de cada cultivo.

1.5. Curvas de crecimiento.

Las curvas de crecimiento se realizaron en tubos de vidrio con 3 mL de medio TY, Bromfield (BF) o Medio mínimo (MM), suplementados con antibióticos en caso de que la estirpe portara algún plásmido. Se partió de una densidad celular inicial de 5×10^7 células mL⁻¹, diluyendo de un preinóculo de TY, BF o MM (con antibióticos en su caso) hasta una D.O.₆₀₀ de 1. La turbidez de los cultivos se determinó a intervalos regulares de tiempo en un espectrofotómetro a una D.O.₆₀₀.

1.6. Ensayos de formación de biopelícula (*biofilm*).

La medida de la capacidad de formación de *biofilm* sobre superficies plásticas por parte de *S. fredii* HH103 y sus mutantes se realizó por el método descrito por Margaret *et al.* (2013). Para ello se crecieron los cultivos en medio MGM y luego se diluyeron hasta una D.O.₆₀₀ de 0,2 y se inocularon 100 µL de cultivo en placas multipocillos de poliestireno. Las placas se cerraron con una tapa estéril para prevenir la evaporación y se incubaron boca abajo a 28°C durante 48 horas sin agitación. El crecimiento bacteriano se cuantificó a través de la medida de la D.O.₆₀₀ al final del experimento usando un lector de placas (Synergy H1; BioTek; EEUU). El contenido de los pocillos se retiró y se secó a temperatura ambiente para luego lavarlos 3 veces con solución salina estéril (NaCl 0,9%). Posteriormente se secaron los pocillos, se tiñeron con 100 µL de cristal violeta 0,1% durante 20 minutos a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Por último, la cuantificación del *biofilm* formado se llevó a cabo por la adición de 100 µL de etanol 96% en cada pocillo para solubilizar el cristal violeta y el cálculo de la cantidad de colorante que se había unido mediante el lector de

placas multipocillos a D.O.₅₇₀. Las medidas de crecimiento de adhesión se hicieron por duplicado (2 réplicas por experimento) y cada experimento se llevó a cabo por triplicado. Además, en cada experimento se midieron al menos 8 pocillos por tratamiento.

En el caso de la formación de *biofilm* sobre superficies de vidrio, las estirpes de *S. fredii* portando el plásmido pFAJDsRed (Kelly *et al.*, 2013) se crecieron (partiendo de una D.O.₆₀₀ de 0,2) en 40 mL de medio MGM en cubetas Coplin previamente esterilizadas a 28°C en estático y conteniendo portacrystales estériles en posición vertical. A las 48 y 72 horas se retiraron varios portacrystales, se secaron a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron en NaCl 0,9% 3 veces. Una vez lavados, se secaron y se observaron y fotografiaron usando el microscopio de epifluorescencia Zeiss Apotome.2 con longitudes de onda (λ) de excitación y emisión de 554 y 586 nm, respectivamente. Se examinó el *biofilm* formado en la zona correspondiente a la interfase aire-líquido.

1.7. Ensayos de movilidad.

Los ensayos de movilidad se realizaron en colaboración con la Doctora Cynthia Alías Villegas del Departamento de Microbiología (Universidad de Sevilla).

1.7.1. Ensayos de movilidad en superficie.

Para mantener la reproducibilidad de los experimentos, los cultivos líquidos de las diferentes estirpes fueron inoculados partiendo del stock de glicerol conservado a -80°C. Las estirpes de *S. fredii* se crecieron a 28°C en medio TY líquido hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 0,9-1. Las células se recuperaron por centrifugación (3 minutos a 12.000 g), se lavaron dos veces con MM y se resuspendieron en una décima parte del volumen inicial con el mismo medio. Se colocaron alícuotas de 2 μ l de la suspensión en placas de Petri que contenían 20 mL de MM con glicerol como fuente de carbono y 0,4% de agarosa (m/v), con genisteína, con etanol como control por ser el solvente del flavonoide o en ausencia de ambos. Las placas se secaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las gotas colocadas en la superficie se dejaron secar a temperatura ambiente durante 10 minutos y las placas se incubaron en posición invertida durante 24, 48 y 72 horas. La comparación de la movilidad en superficie entre las estirpes mutantes y la parental se realizó mediante la medida de la longitud de cada uno de los lados del teórico rectángulo que engloba a la colonia (en centímetros) y realizando la media de estos valores (3 réplicas por experimento). Se realizaron un mínimo de tres experimentos independientes y a los resultados obtenidos se les realizó la estadística correspondiente.

1.7.2. Ensayos de movilidad de tipo *swimming*.

De igual forma que en la movilidad en superficie, las diferentes estirpes se crecieron a partir del stock de glicerol, a 28°C en medio TY líquido hasta una D.O.₆₀₀ de 0,9-1. Las placas de Petri se prepararon con 25 mL de medio Bromfield con 0,3% de agar (m/v), suplementado con genisteína, con etanol o en ausencia de ambos, y se secaron a temperatura ambiente cerradas durante al menos dos horas. Alícuotas de 3 µl del cultivo se introdujeron con la punta hasta la mitad del grosor del medio de cultivo. Una vez colocadas las gotas, las placas se rodearon de parafilm y se incubaron en posición invertida durante 24, 48 y 72 horas, tiempo en el que se tomaron las diferentes medidas (3 réplicas por experimento). La comparación de la movilidad *swimming* de los mutantes con respecto al parental, se realizó midiendo el halo de dispersión de la colonia en los diferentes tiempos y con al menos tres experimentos independientes. Por último, a los resultados obtenidos se les aplicó el test estadístico correspondiente.

1.7.3. Microscopía electrónica de transmisión.

La visualización de los flagelos bacterianos al microscopio electrónico de transmisión (MET) se ha realizado por tinción negativa siguiendo el protocolo descrito por Calatrava-Morales *et al.* (2017). Las rejillas utilizadas para estos experimentos fueron rejillas Formvar recubiertas de carbono. Para ello las células se tomaron del borde de las colonias de los experimentos de superficie a las 24 horas, disponiendo las rejillas sobre las mismas. De este modo las células quedan adheridas a las rejillas. Posteriormente se colocaron 5 minutos encima de una gota de agua, luego se lavaron las rejillas en agua dos veces durante 1 minuto y se tiñeron con acetato de uranilo al 2 % (m/v) durante 3 minutos. Las rejillas se dejaron secar al menos 1 hora y se visualizaron usando el microscopio electrónico de transmisión ZEISS LIBRA 120 con un haz de 100 kV en el Servicio de Microscopía del CITIUS (Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla).

1.8. Métodos relacionados con ácidos nucleicos.

1.8.1. Métodos de transferencia de ADN.

1.8.1.1. Conjugación bacteriana triparental.

Para la transferencia por conjugación de diversos plásmidos desde *E. coli* a *Sinorhizobium* se llevó a cabo el siguiente procedimiento.

- Se mezclaron en un tubo *ependorf* los siguientes cultivos:

- 1.- 200 μL de un cultivo en fase logarítmica de la estirpe de *E. coli*, portadora del plásmido pRK2013, que actuó como coadyuvante en la transferencia de los plásmidos (que contienen el sitio *mob*).
- 2.- 200 μL de un cultivo en fase logarítmica de la estirpe de *E. coli* donadora del plásmido en cuestión.

A continuación, la mezcla se centrifugó durante 2 minutos a 9.600 *g*. El sobrenadante se retiró con cuidado y las células se resuspendieron en 1 mL de TY y se centrifugaron nuevamente a 9.600 *g* durante 2 minutos. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en 1 mL de cultivo en TY de la estirpe de *Sinorhizobium* receptora, volviéndose a centrifugar a 9.600 *g* 5 minutos. Seguidamente, se retiró el sobrenadante dejando alrededor de 75 μL de este para resuspender el pellet y se colocó en forma de parche en una placa con medio TY sin antibióticos. La placa se incubó a 28°C durante no más de 24 horas. La masa celular desarrollada se recogió y se resuspendió en 1 mL de TY. Posteriormente se realizaron las diluciones apropiadas para sembrar placas de TY con los antibióticos adecuados y así seleccionar las estirpes transconjugantes. Las colonias desarrolladas se purificaron por sucesivas siembras en el mismo medio selectivo.

En algunos casos se utilizó como estirpe donadora la cepa S17-1 de *E. coli*, que no necesita coadyuvante por contener en su genomio los genes necesarios para la transferencia de los plásmidos con sitio *mob*.

1.8.1.2. Transformación de *E. coli*.

Se siguió el método del TSS (*Transformation and Storage Solution*) descrito por Chung *et al.* (1989). En primer lugar, se prepararon las células competentes de *E. coli*. Se preinoculó una colonia de *E. coli* DH5 α en tubos con 5 mL de medio LB líquido suplementado con ácido nalidíxico (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), y se creció a 37 °C en agitación durante toda la noche. Se inocularon tubos con 5 mL de medio LB líquido con 200 μL del cultivo de la estirpe *E. coli* ya crecida. Cuando la D.O.₆₀₀ fue de 0,3-0,4, se transfirió 1 mL de cultivo a un tubo *ependorf*, que se mantuvo durante 5 minutos en hielo, y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. El sobrenadante se descartó y las células se resuspendieron en 75 μL de LB estéril frío y se mantuvieron durante 5 minutos en hielo. Posteriormente, se añadió 75 μL de TSS 2X frío, se mezcló todo suavemente y se mantuvo la mezcla en hielo durante 5 minutos. De esta manera se obtuvieron células competentes de forma rápida inmediatamente antes de realizar la transformación. El plásmido o la mezcla de ligación a transformar se añadió a las células competentes y se

incubó en hielo durante al menos 30 minutos. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico (42°C durante 1 minuto 30 segundos y 5 minutos en hielo) para permitir la entrada del plásmido en la célula. Finalmente se añadió 1 mL de LB y se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras la incubación, la mezcla se centrifugó durante 30 segundos a 10.000 g y se descartó el sobrenadante, dejando alrededor de 75 µL que se usaron para resuspender el pellet. Este pellet resuspendido se sembró en placas de medio LB con los antibióticos adecuados y se incubó a 37°C durante 24 horas.

Cuando el marcador del plásmido transferido era la resistencia a gentamicina, después de incubar la mezcla de la transformación en 1 mL de LB a 37°C durante 1 hora, se le añadió gentamicina a una dosis de 1 µg mL⁻¹ y se incubó a la misma temperatura otra hora antes de seleccionar las células transformantes.

Soluciones empleadas:

TSS 2X	Triptona 0,8 g, extracto de levadura 0,5 g, NaCl 0,5 g, polietilenglicol 20 g, 10 mL DMSO (dimetil sulfóxido), 10 mL MgSO ₄ 1M. Completar con agua destilada hasta 100 mL. Ajustar el pH a 6,5.
--------	--

1.8.2. Extracción del ADN genómico.

Se centrifugó 1,5 mL de un cultivo en fase estacionaria a 13.000 g durante 1 minuto. El pellet se resuspendió en 570 µL de tampón TE y se añadió 6 µL de proteinasa K (10 mg mL⁻¹) y 30 µL de SDS al 20% (m/v). La mezcla se incubó durante toda la noche a 37°C. Posteriormente, se potenció el lisado de las células mediante el uso de una jeringuilla por la que se pasó tres veces el contenido de la mezcla y a ésta se le añadió un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Los líquidos se mezclaron manualmente mediante la inversión del tubo, tras lo que el tubo se centrifugó a 13.000 g durante 5 minutos. La fase superior acuosa donde se encuentran los ácidos nucleicos se transfirió a un nuevo tubo y se añadió un volumen de solución cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) mezclando las dos fases por inversión del tubo. Se centrifugó a 13.000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente y la fase superior (acuosa) se transfirió a un nuevo tubo.

A continuación, se procedió a la precipitación del ADN. Para ello, se añadió 0,1 volumen de acetato sódico 3M y 0,8 volumen de isopropanol, se mezcló suavemente y se dejó precipitar a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 13.000 g durante 20 minutos. Se eliminó el sobrenadante, el pellet se lavó con 500 µL de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó a 13.000 g durante 4 minutos a 4°C. Finalmente, se dejó secar

al precipitado de ADN a temperatura ambiente durante 30-40 minutos y se resuspendió en 100 μ L de tampón TER.

Soluciones empleadas:

TE	Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM
TER	Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8, ARNasa 50 μ g mL ⁻¹

1.8.3. Extracción del ADN plasmídico (minipreps).

La extracción de plásmidos de cultivos de *E. coli* se realizó utilizando el kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, EEUU). La extracción se realizó siguiendo el protocolo del fabricante a partir del pellet obtenido de la centrifugación a 13.000 g durante 1 minuto de 1,5 mL de cultivos bacterianos en fase estacionaria que se crecieron en LB en un agitador orbital (180 r.p.m.) durante 24 horas a una temperatura de 37 °C.

1.8.4. Restricción del ADN.

Se utilizaron las endonucleasas de restricción suministradas por Roche (Suiza) y NewEngland Biolabs (EEUU). En todos los casos se siguieron las instrucciones del fabricante. La eficiencia de la restricción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

1.8.5. Electroforesis del ADN.

Se llevó a cabo en geles de agarosa entre el 0,8% y el 2% (m/v) en tampón TAE 0,5X, preteñidos con bromuro de etidio. La concentración de agarosa empleada dependió del peso molecular de los fragmentos que se quisieron separar (Sambrook *et al.*, 1989). Las muestras de ADN mezcladas con el tampón de carga se añadieron a los pocillos del gel. Como patrones de referencia se usaron diferentes marcadores de peso molecular, como el ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *HindIII* o marcadores tipo *ladder* de 100-pb o de 1-kb. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas Mupid-One (Advance, Japón) a 100 V. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV a 260 nm. Las imágenes se capturaron mediante el aparato de captación de imágenes Gel DocTM XR+ (Bio-Rad, EEUU) y se analizaron con el programa informático Image LabTM (Bio-Rad, EEUU).

Soluciones empleadas:

Tampón TAE	Tris-HCl 30 mM, 0,002% (v/v) EDTA 0,5M pH 8, ácido acético glacial 0,00114% (v/v). Ajustar el pH a 8
Tampón de carga	Azul de bromofenol 0,25% (m/v), xileno cianol FF 0,25% (m/v), glicerol 30% (v/v)

1.8.6. Aislamiento del ADN de geles de agarosa.

Para recuperar fragmentos de ADN de un gel de agarosa se cortó la porción de éste que contenía la banda de interés. El ADN se purificó mediante el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EEUU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

1.8.7. Desfosforilación del ADN.

Se empleó para reducir la autoligación de vectores linealizados mediante restricción con una sola endonucleasa. Tras la restricción, se añadió a la mezcla de reacción la enzima fosfatasa alcalina (Roche, Suiza) y se incubó la reacción durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente, se inactivó la enzima incubando la mezcla durante 15 minutos a 65°C.

1.8.8. Ligación del ADN.

Para clonar un fragmento de ADN en un vector, los fragmentos de ADN previamente digeridos con la(s) enzima(s) de restricción adecuada(s), se purificaron mediante el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, EEUU), se mezclaron en las proporciones adecuadas (3:1, inserto: vector) y se les añadió 1/10 del volumen final del tampón de ligación y 1 µL (1 U µL⁻¹) de la ligasa del fago T4 (Roche, Suiza; New England Biolabs, EEUU). La mezcla se incubó durante un mínimo de 1 hora a temperatura ambiente. Los productos de la reacción se utilizaron para transformar células competentes mediante el método descrito anteriormente (1.8.1.2).

1.8.9. Amplificación del ADN por PCR.

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Saiki (1990). Los programas usados en cada caso siguen el siguiente esquema común:

- 1.- Desnaturalización del ADN a 95°C durante 5 minutos.
- 2.- Desnaturalización del ADN a 95°C durante 30 segundos.
- 3.- Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante (Tib Molbiol, Alemania) durante 30 segundos.

4.- Polimerización del ADN a 68-72°C, variando el tiempo de polimerización en función del tamaño del ADN a amplificar y de la polimerasa que se use.

5.- Repetición del ciclo de polimerización (desde el paso 2), 34 veces más.

6.- Polimerización del ADN a 68°C durante 5 minutos.

El volumen de la mezcla de reacción varió dependiendo del experimento. Como norma general, 20 μ L de mezcla de reacción contenían los cebadores adecuados a una concentración de 0,2 μ M, dNTPs a 0,2 mM, tampón de PCR 1X y 0,1 U de la enzima polimerasa. Las polimerasas usadas fueron: *Taq* polimerasa (New England Biolabs, EEUU) y Q5 High-Fidelity DNA polimerasa (New England Biolabs, EEUU), esta última se usó sólo para realizar amplificaciones donde era necesaria conservar la secuencia sin errores, por ejemplo, para realizar las construcciones para obtener un mutante por delección o para secuenciar fragmentos de ADN.

Los cebadores utilizados para la amplificación de fragmentos de ADN para su posterior clonación (**Tabla 3**) fueron diseñados con una longitud de alrededor de 20 pb. Además, en algunos casos en las secuencias de los cebadores se incluyeron dianas para enzimas de restricción. En este último caso, las dianas se situaron en los extremos 5' de los cebadores, añadiendo tres nucleótidos por delante para facilitar el “anclaje” de la endonucleasa.

Tabla 3. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para clonación. Las temperaturas de unión recogidas en la tabla se refieren a la secuencia homóloga a la del genomio “diana”.

Nombre	Secuencia (5'-3')	pb	T _m (°C)
lacZintR	GCCTCTTCGCTATTACGCCA	20	58
OmegaintR	GGCCTTGATGTTACCCGAGA	21	59
pVO155gusA_R	ACTTCGCGCTGATACCAGAC	20	57
promotorflgJ-F1	CGGAGATCTACCAGCTCACCAGCATGATC	29	58
promotor-R	CGGTCTAGAGCAATCAGTGCGAACCGGAG	29	60
promotorflgJ-F2bisEco	GAGGAATTCAGAGGCACGCACGATGGAAG	29	66
promotor-RbissphI	CGGGCATGCGCAATCAGTGCGAACCGGAG	29	72

operonflgJFKpnI-F	CGGG <u>GTACCACC</u> AGCTCACCAGCATGATC	29	69
operonflgJ348-R	GCGT <u>CTAGA</u> AGCTTCCTGTCTTCGAGGAC	29	65
shcintF	<u>GTCGACGCGG</u> CTCATATGGT	20	60
shcintR	GAT <u>TCTAGACT</u> CACGAAGTTTCTTCGGAA	29	58
373intF	GAT <u>GTCGACG</u> CCTTTGGCTGAGCTGTACCA	29	65
373intR	CCG <u>TCTAGA</u> ACGTACAATCCACGAAGGTA	29	60
371.5F	<u>GTCGACGG</u> CATGGAAATGGACGTGCT	26	65
371.5R	CCG <u>TCTAGACC</u> CTTATCAGCAGCAGGTCC	29	65
d_208 FSaII	TCT <u>GTCGACT</u> CGACAAGGCGAAGGAACTG	29	64
d_208 RXbaI	TTTT <u>CTAGAG</u> TTTAAACGCGGCCATCCTTC	29	60
d_448 FSaII	CTT <u>GTCGACG</u> GGTTCGAACTGTTGCTTCTC	29	64
d_448 RXbaI	TACT <u>CTAGAG</u> CGTTCTTGCGATCCATAGC	29	61

1.8.10. RT-PCR.

Esta técnica se llevó a cabo para verificar si dos genes forman parte de la misma unidad transcripcional. Para ello, se realizó una extracción de ARN total, en las condiciones a estudiar, y posterior retrotranscripción del mismo modo que se describe en la sección 1.8.20.1. El ADNc obtenido se usó como molde en una PCR convencional en la que se emplearon cebadores internos de los genes a estudiar como controles positivos de expresión, y cebadores que amplifiquen parte del extremo 3' de un gen y parte del extremo 5' del siguiente, de tal modo que, si forman una unidad transcripcional, se obtiene amplificación ya que existirá un ARNm común para ambos genes (**Tabla 4**). Además, se emplean una serie de controles:

- ADN genómico (ADNg): Se usa como molde en otra PCR en paralelo con los mismos cebadores y en la que se obtiene amplificación tanto en los cebadores internos de los genes como en los intergénicos.
- ARN: Se usa como control negativo debido a que no se debe obtener amplificación con ninguna de las parejas de cebadores al no estar presente ningún tipo de ADN (ADNc o

ADNg), salvo que exista contaminación. De este modo se asegura que el ADNc de la retrotranscripción no posee ADNg.

Tabla 4. Cebadores empleados en experimentos de RT-PCR.

Nombre	Secuencia (5'-3')	pb	Tm (°C)
346-347_F	ATCGGCATTGCCGACCGAAT	20	61
346-347_R	GCAACATCGTCAGCTCGTAG	20	57
346-347_2F	GAGGTCTGGAAAGGCATGAT	20	56
346-347_2R	CGTTGTCGATGATCATCTCC	20	54
347-348_F	GGCAGAAGCTCAAGCTCAAC	20	57
347-348_R	GATCACCGGAACGGTAATGA	20	55
348-349_F	CTGGTCGAACAGCTCGAATA	20	55
348-349_R	TGCTCGAGCATCAACGCGAC	20	61
346q-F	TGCTGAATTCCTCGGAAG	18	52
346q-R	CAGCATCGACTTGACGAA	18	52
rt-16S-F2	GATACCCTGGTAGTCCAC	18	51
rt-16S-R2	TAAACCACATGCTCCACC	18	53

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

Esta técnica está basada en el método de Griffiths y Long (2008), con algunas modificaciones. Se realizaron los siguientes pasos de amplificación por PCR:

1.-Amplificación de fragmentos de entre 500 a 700 pb de longitud, de las regiones flanqueantes al gen que se desea mutagenizar. Para ello, se añadió en un volumen de 20 µL: 10 ng de ADN genómico, 0,2 µM de cada cebador (cebadores 1 y 2 para la PCR de la región flanqueante derecha y cebadores 3 y 4 para la PCR de la región flanqueante izquierda; **Tabla 5**), 0,2 mM de dNTPs y 0,1 U de una polimerasa de alta fidelidad. Se siguió el esquema general descrito anteriormente para la programación del termociclador.

Los cebadores 1 y 4 contienen dianas para determinadas enzimas de restricción. Las PCR se realizaron utilizando una *Taq* polimerasa de alta fidelidad (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, New England Biolabs).

2.- PCR solapante usando como ADN molde ambos productos amplificados en el paso anterior. A la mezcla de 20 µL de reacción se le añadió una concentración de 2 ng de cada fragmento de ADN molde, 0,2 µM de los cebadores 1 y 4, 0,2 mM de dNTPs y 0,1 U de la polimerasa. Esta PCR comenzó con dos ciclos en los que las temperaturas de desnaturalización y polimerización fueron menores que la que se establece en el esquema general. De esta forma se favoreció que los dos fragmentos que se usaron como ADN molde se mantuvieran unidos. A continuación, las muestras se sometieron a 35 ciclos siguiendo el esquema de PCR que se describe anteriormente (apartado 1.8.9). Un esquema de este método de delección se muestra en la **Figura 10**.

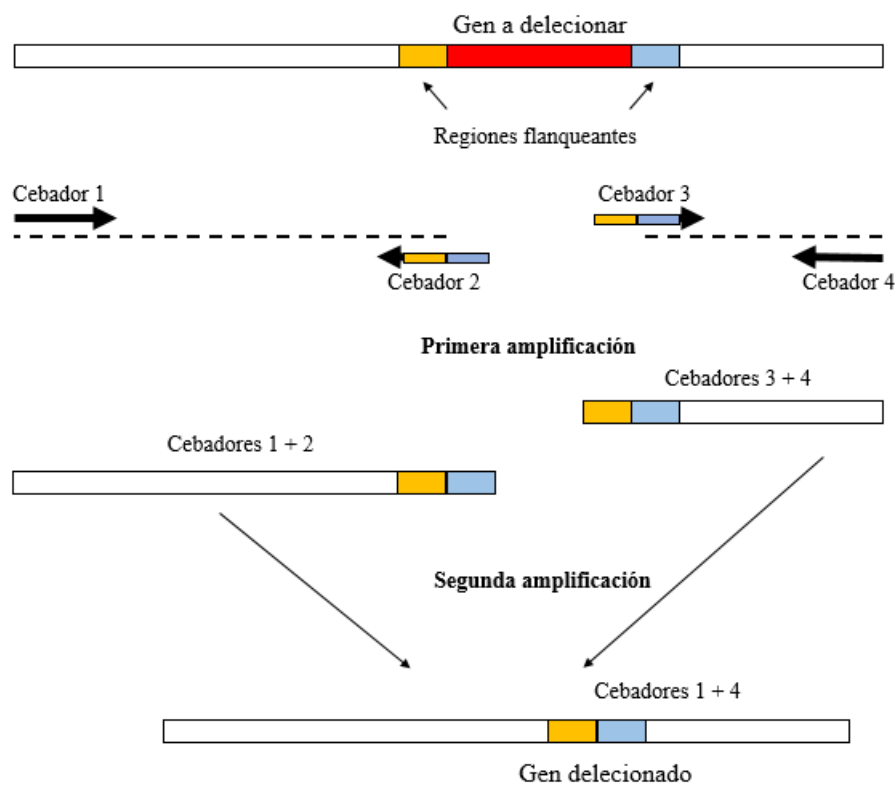


Figura 10. Esquema de la mutagénesis *in vitro* por delección mediante PCR solapante.

El amplicón obtenido en este último paso, que contiene las regiones que flanquean el gen que se pretende deleccionar, se cortó con las enzimas seleccionadas y se clonó en el plásmido *pK18mobsacB* digerido con las mismas enzimas. El plásmido obtenido se introdujo por transformación en *E. coli*, y desde esta bacteria se transfirió por conjugación triparental a *S. fredii* HH103 para obtener la correspondiente estirpe mutada por delección

mediante doble recombinación y selección en medio suplementado con la concentración de sacarosa adecuada.

Tabla 5. Cebadores utilizados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para la mutagénesis *in vitro* por delección mediante PCR solapante.

Nombre	Secuencia (5'-3')	pb	Tm (°C)
flgJ-A	GGAAAGCTTCGATGAAGTCGCGATCGGAA	29	63
flgJ-B	CCCGGCCAAAAAATGTCAGATCCTCTCA	28	62
flgJ-C	TGAGAGGATCTGACATTTTTTGGCCGGG	28	62
flgJ-D	CGAGGCGTACTGCATCGAGA	20	59
HH00347A	ACGTCTAGAAAGGCCAATCGCGCCGCCTT	29	68
HH00347B	GAGCTTCAGCATCAAAATCAACTCCCAA	28	59
HH00347C	TTGGGAGTTGATTTTGATGCTGAAGCTC	28	59
HH00347D	TTGGCATGCTCACTGCACCCTCGGGGATCG	30	69
HH00348A	TCGAAGCTTCGCGCGGCTTGATGACGATA	29	66
HH00348B	CCCTTCAACGCTCCCAGAAATCGCTATA	28	61
HH00348C	TATAGCGATTTCTGGGAGCGTTGAAGGG	28	61
HH00348D	GCGGAATTCAGCTTCCTGTCTTCGAGGAC	29	63

1.8.12. Transferencia por conjugación de derivados del plásmido pK18*mobsacB*.

La construcción de mutantes por delección (sección 1.8.11) se llevó a cabo utilizando el plásmido pK18*mobsacB*. Las estirpes de *Sinorhizobium* obtenidas por el método anteriormente descrito, sensibles a sacarosa y resistentes a Km (simples recombinantes), se inocularon en TY sin antibióticos y se incubaron durante alrededor de 4 días en agitación a 28°C, lo que favorece los procesos de auto-recombinación. Transcurrido ese tiempo, se sembraron alícuotas de 100 µL, provenientes de diluciones seriadas del cultivo crecido, en placas de TY con sacarosa y se incubaron a 28°C. Una vez que las colonias resistentes a sacarosa crecieron, se sembraron con palillos de dientes en placas que

contenían o no Km. De esta forma se detectaron posibles dobles recombinantes que crecen en sacarosa 12,5% (es viable si la estirpe no tiene el gen *sacB*) y no en presencia de kanamicina. De los candidatos obtenidos, se comprobó si tenían el gen deletado por PCR y/o hibridación.

1.8.13. Hibridación ADN::ADN.

Se empleó un sistema no radiactivo que se basa en el marcaje al azar de ADN con digoxigenina-UTP y la detección de los híbridos ADN::ADN-digoxigenina mediante enzimoimmunoensayo. Para esta detección se utilizó un anticuerpo conjugado (antidigoxigenina conjugado con la enzima fosfatasa alcalina). El resultado de la hibridación se obtuvo por reacción colorimétrica en el mismo filtro de hibridación.

1.8.13.1. Transferencia del ADN a filtros de nylon.

Tras extraer el ADN total y tras la digestión con la(s) enzima(s) de restricción adecuada(s) se realizó la electroforesis en gel de agarosa. Los fragmentos de ADN, junto con el marcador de peso molecular λ *HindIII* marcado con digoxigenina (Roche, Suiza), se transfirieron a filtros de nylon (Southern, 1975) Hybond-N (Amersham Biosciences, UK). Para ello, el gel inmediatamente después de la electroforesis, se sumergió en HCl 0,25M durante 20 minutos con agitación suave. Posteriormente, se lavó con agua destilada y se mantuvo en una solución de desnaturalización durante 30 minutos en agitación. La transferencia del ADN a los filtros se realizó por presión durante aproximadamente 15 horas en presencia del tampón de transferencia alcalino. Transcurrido ese tiempo, los filtros se lavaron en SSC 2X durante 5 minutos. Finalmente, el ADN se fijó al filtro por exposición a la luz ultravioleta durante 2 minutos.

Soluciones empleadas:

SSC 20X	NaCl 2,1 M, citrato de sodio 0,3 M. Ajustar el pH a 7
Solución de desnaturalización	NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M
Tampón de transferencia alcalino	NaCl 1,5 M, NaOH 0,25 M

1.8.13.2. Marcaje de la sonda.

El marcaje de la sonda se realizó mediante una PCR en la que se añadió a la mezcla normal de PCR 1 μ L de dNTPs 10X que contienen UTP marcado con digoxigenina.

1.8.13.3. Hibridación de la sonda al ADN del filtro.

Al filtro de nylon se le añadió la solución de pre-hibridación (entre 1 y 10 mL, dependiendo del tamaño del filtro), que contenía esperma de salmón ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) previamente desnaturalizado por calor (95°C durante 10 minutos y 5 minutos en hielo). El filtro se pre-hibridó con esta solución incubándolo de 2 a 6 horas a 42°C . Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de pre-hibridación y se añadió la sonda, previamente desnaturalizada por calor (95°C durante 10 minutos y 5 minutos en hielo) y diluida en 2,5 mL de solución de pre-hibridación. El filtro se incubó con esta nueva solución durante toda la noche a 42°C .

Transcurrido este tiempo se procedió a lavar el filtro. Se lavó dos veces con una solución de SSC 2X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se lavó otras dos veces con SSC 1X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente y, por último, se realizaron dos lavados más con SSC 0,1X, SDS 0,1% durante 15 minutos a 68°C .

Soluciones empleadas:

SSC 20X	NaCl 2,1 M, citrato de sodio 0,3 M. Ajustar el pH a 7
SDS 20% ^a	SDS 200 g L^{-1}
Solución de pre-hibridación ^b	100 mL SSC 20X (v/v), 0,4 mL SDS 20% (m/v), 100 mL H ₂ O, 20 g de reactivo de bloqueo (Roche), 0,4 g N-laurilsarcosina

^a Calentar 800 mL de agua destilada, añadir el SDS, ajustar el pH a 7,2 y enrasar a 1 L con agua destilada.

^b Disolver el reactivo de bloqueo con agitación magnética y calor y añadir el mismo volumen de formamida desionizada. Se almacena a -20°C .

1.8.13.4. Detección inmunológica.

Después de realizar los lavados, el filtro se incubó durante 5 minutos en 100 mL de tampón 1 a temperatura ambiente y en agitación, para eliminar los restos de SDS. Posteriormente, el filtro se introdujo en bolsas de hibridación junto con 10 mL de tampón 2 y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, se retiró el tampón 2 y se cambió por una nueva solución de tampón 2 que contenía el anticuerpo anti-digoxigenina en una proporción de 1:5000 (v/v). El filtro se incubó en esta solución durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Para eliminar el anticuerpo no fijado, el filtro se extrajo de las bolsas y se lavó dos veces

durante 15 minutos en 100 mL de tampón 1 a temperatura ambiente con agitación. Finalmente, el filtro se equilibró en 50 mL de tampón 3 durante 5 minutos. Para visualizar el resultado se usó un método colorimétrico que consiste en introducir los filtros en bolsas de hibridación herméticamente selladas junto con una solución de revelado. Las bolsas se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que el resultado de la hibridación fuera claramente visible. Posteriormente los filtros fueron lavados con agua destilada y se secaron al aire.

Soluciones empleadas:

Tampón 1	Tris-HCl 100 mM pH 8 y NaCl 150 mM
Tampón 2	Reactivo de bloqueo al 2% (m/v) disuelto en tampón 1*
Tampón 3	Tris-HCl 80 mM pH 9,5, NaCl 100 mM y MgCl ₂ 50 mM
Solución de revelado	66 µL de solución NBT (75 mg mL ⁻¹ de nitroazul tetrazolio en dimetilformamida al 70%), 66 µL de solución BCIP (50 mg mL ⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en dimetilformamida al 100%) en 10 mL de tampón 3

* Disolver el reactivo de bloqueo con agitación magnética y calor. Almacenar a 4°C.

1.8.14. Secuenciación del ADN.

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en los servicios de secuenciación de la empresa STAB VIDA (Portugal).

1.8.15. Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas.

Para el análisis informático básico de las secuencias de ADN y proteínas se emplearon los programas de comparación de secuencias BLASTn y BLASTp disponibles en la página web del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Para otro tipo de análisis de las secuencias de nucleótidos se utilizó ApE-A plasmid Editor v2.0.47. Para la búsqueda de las *tts boxes* se empleó el patrón descrito para ello, {t}tcagn[tg][tcg]n[ta]n[ga]nna[gat]n(11)a (Zehner *et al.*, 2008), mediante la herramienta *fuzznuc* del paquete informático EMBOSS (Rice *et al.*, 2000)

1.8.16. Análisis informático de estructura de proteínas.

Para el análisis informático básico de las estructuras de las proteínas estudiadas en esta Tesis se empleó el programa “Phyre2” (*Protein Homology / AnalogY Recognition Engine*

2) de predicción de la estructura de proteínas disponible en la página web www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi.

1.8.17. Análisis estadístico.

Los análisis estadísticos de los resultados fueron realizados con el programa *Excel*, con el complemento *Megastat*. Cada tratamiento fue individualmente comparado con el control mediante el test no paramétrico de U de Mann-Whitney.

1.8.18. Visualización de las nubes de transcritos.

Para la visualización de los transcritos mapeados al genoma de *S. fredii* HH103 se emplearon los archivos .fasta, .gff, .bam y .bai a través del programa de visualización IGV versión 2.8.2 (*Integrative Genomics Viewer*) y el programa Geneious Prime 2020.

1.8.19. Ensayos de doble híbrido.

Para realizar el experimento de doble híbrido se utilizó el kit *Bacterial Adenylate Cyclase TwoHybrid System* (Euromedex) cuyo fundamento principal consiste en fusionar los genes de las proteínas cuya interacción se quiere observar con las secuencias codificantes de dos fragmentos complementarios de la proteína adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis*. Estos dos fragmentos complementarios de *B. pertussis* son T25 y T18, que no son activos cuando se encuentran físicamente separados. Cuando ambos fragmentos se fusionan con proteínas que interaccionan, X e Y, se produce la heterodimerización de estas proteínas resultando en una complementación funcional entre los fragmentos T25 y T18 y, por tanto, la síntesis de AMPc (**Figura 11**). Así, al co-transformar células con los plásmidos que contienen los dos fragmentos de la adenilato ciclasa por separado, si las proteínas de interés interaccionan, se regenera la actividad de la adenilato ciclasa que da lugar a la producción de AMPc, activando el operón *lac* y haciendo que las células sean capaces de degradar el sustrato X-Gal que da un producto de color azulado. Para llevar a cabo este ensayo, se diseñaron cebadores (**Tabla 6**) utilizados para la amplificación de los genes *flgJ*, SFHH103_00347 y SFHH103_00348 (capítulo 3) y *nodD1* y *nodD2* (capítulo 4) para su posterior clonación de modo que sus productos se expresaran como proteínas de fusión a los fragmentos T25 y T18 de la proteína adenilato ciclasa. Los vectores recombinantes se co-transformaron en células de *E. coli* BTH101 con 50 ng de los dos plásmidos compatibles, uno de los cuales poseía el fragmento T25 y el otro el fragmento T18 de la adenilato ciclasa. Además, se utilizaron

los plásmidos pUT18C-zip y pKT25-zip como controles positivos, puesto que las proteínas de fusión a T18 y T25 codificadas por dichos plásmidos interaccionan entre sí. Se analizaron las interacciones tanto de las proteínas entre ellas como de las proteínas consigo mismas para analizar la posible formación de homodímeros. Para cada pareja se analizaron todas las posibles combinaciones (8 por cada pareja de proteínas a estudiar). De esta forma se asegura que ninguna de las interacciones entre los dos fragmentos de la adenilato ciclasa se vean afectadas por los impedimentos estéricos que supone la fusión de las proteínas.

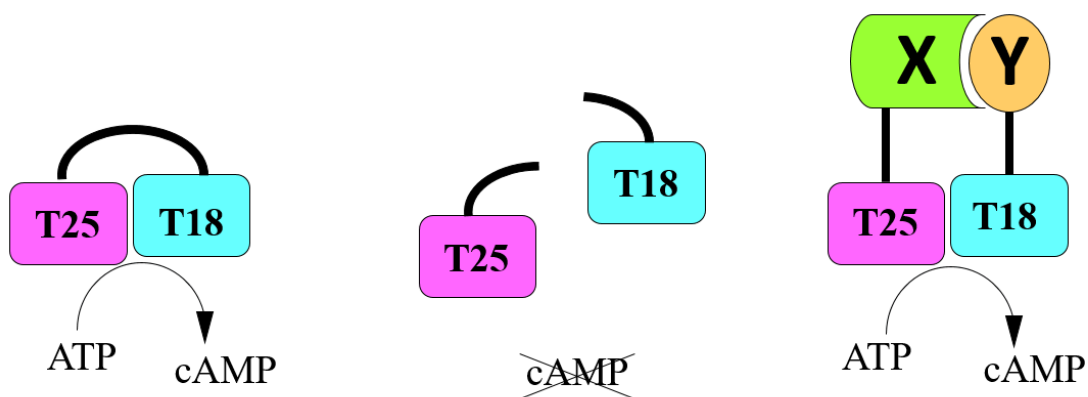


Figura 11. Principio del sistema de doble híbrido en bacterias. Figura modificada del manual del sistema BACTH (Euromedex).

Tabla 6. Cebadores empleados en esta Tesis para amplificar fragmentos de ADN para los ensayos de doble híbrido.

Nombre	Secuencia (5'-3')	pb	Tm (°C)
FlgJpKNT25XbaI	AGG <u>TCTAGAG</u> ATGGCTATTTCCCCGCC	28	59
FlgJpKNT25	AAAG <u>GTACCC</u> GTGCCTGGTTCTTCTTTTC	29	51
KpnIsinstop			
FlgJHibriXbaI	AGG <u>TCTAGAG</u> ATGGCTATTTCCCCGCC	28	59
FlgJHibriKpnI stop	CCAG <u>GTACCC</u> GCTATGCCTGGTTCTTCTT	29	50
347pKNT25XbaI	GAG <u>TCTAGAG</u> ATGGAAGCTGTGGCATC	27	53
347pKNT25KpnI	TCAG <u>GTACCC</u> GGAAATCGCTATAGCGGAA	29	50
347pKT25XbaI	GAG <u>TCTAGAG</u> ATGGAAGCTGTGGCATC	27	53

347pKT25KpnI	GCTGGTACCCGTCAGAAATCGCTATAGCG	29	50
347pUT18CXbaI	GAGTCTAGAGATGGAAGCTGTGGCATC	27	54
347pUT18CKpnI	GCTGGTACCCGTCAGAAATCGCTATAGCG	29	54
347pUT18XbaI	GAGTCTAGAGATGGAAGCTGTGGCATC	27	54
347pUT18KpnI	TCAGGTACCCGGAAATCGCTATAGCGGAA	29	56
348pUT18CXbaI	CGATCTAGAGATGCTGAAGCTCGTTCT	27	53
348pUT18CKpnI	CAAGGTACCCGTCAATGGCCGCTTGACGC	29	63
348pUT18XbaI	CGATCTAGAGATGCTGAAGCTCGTTCT	27	53
348pUT18KpnI	CGCGGTACCCGATGGCCGCTTGACGCCTT	29	64
NodD1NXbaI	AGGTCTAGAGATGCGTTTTAAGGGCCTT	28	52
NodD1NKpnIstop	AAAGGTACCCGGAGGCATGTAGGCAATTG	29	51
NodD1CKpnIstop	AAAGGTACCCGTTAGAGGCATGTAGGCAA	29	51
NodD2NXbaI	AGGTCTAGAGATGCGTTTTAAGGGACTT	28	49
NodD2NKpnIstop	AAAGGTACCCGGGGTCGATATTCCACTGA	29	51
NodD2CKpnIstop	AAAGGTACCCGCTAGGGTCGATATTCCAC	29	51

Las células co-transformadas se sembraron en placas de LB con los antibióticos de selección de ambos plásmidos y X-Gal como sustrato revelador de la interacción. Las placas se dejaron a 30°C durante 24 horas. Las colonias crecidas se inocularon en tubos de LB con los antibióticos adecuados y se dejaron crecer en agitación a 30°C durante 24 horas. Finalmente se pusieron gotas de los cultivos crecidos en placas de LB con los antibióticos, X-Gal a 40 µg mL⁻¹ e IPTG a 0,5 mM y en placas de McConkey con antibióticos, y se dejaron a 30°C durante 24 horas. Dos proteínas interaccionan cuando las gotas son azules en LB con X-Gal y rojas en el medio McConkey debido a que la fermentación de los azúcares acidifica el medio y se produce un cambio de color del colorante rojo fenol (**Figura 12**).

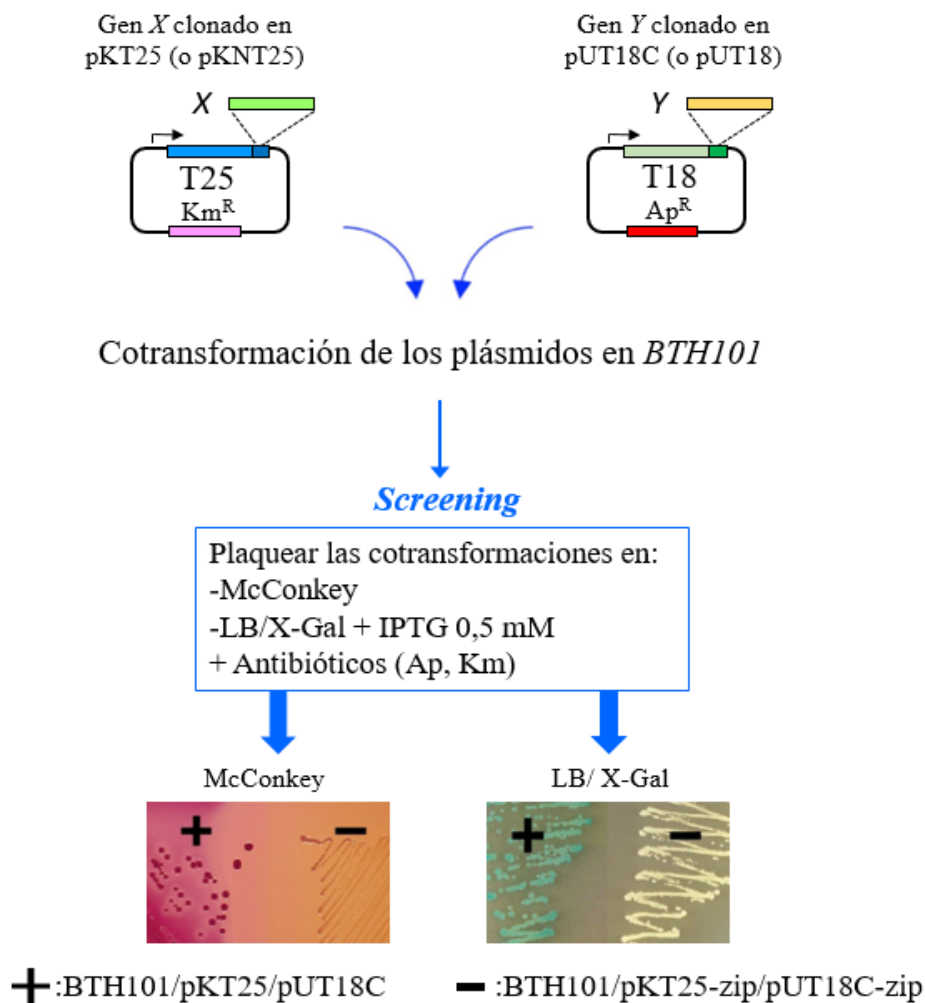


Figura 12. Metodología para analizar la interacción proteína-proteína con el sistema BACTH. Figura modificada del manual del sistema BACTH (Euromedex).

1.8.20. Cuantificación de la expresión de genes bacterianos.

1.8.20.1. PCR cuantitativa (qPCR).

Una de las estrategias seguidas para cuantificar la expresión de genes bacterianos fue realizar experimentos de qPCR a partir de los ARNm de dichos genes, previamente retrotranscritos a ADNc. Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

- 1.- Extracción del ARN total bacteriano en las diferentes condiciones experimentales a estudiar.
- 2.- Retrotranscripción del ARN total a ADNc.
- 3.- Realización de la PCR cuantitativa.

Para la extracción del ARN total, se incubaron los cultivos de las estirpes de *S. fredii* a estudiar en medio YM (suplementado con flavonoides cuando fue necesario) a 28°C a 180 r.p.m. hasta que alcanzaron una D.O.₆₀₀ de 0,5-0,8. La extracción del ARN bacteriano

se realizó utilizando el kit *High pure RNA isolation* (Roche, Suiza), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido se cuantificó en un espectrofotómetro adecuado para pequeños volúmenes (μL): *Thermo Scientific NanoDrop* (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Para comprobar la integridad del ARN, éste se sometió a electroforesis en gel de agarosa, se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó con luz UV. Para ello, se añadieron 1-2 μl de la solución con ARN (según la concentración) a 2 μl de tampón de carga con bromuro de etidio. La mezcla se cargó en un gel de agarosa compuesto por agarosa al 1,4% (m/v), tampón MOPS 4X, formaldehido como agente desnaturalizante y agua. La electroforesis se llevó a cabo durante 15 minutos a 120 V en tampón MOPS 1X.

La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando el kit *PrimeScript RT reagent* (Takara, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó como molde para llevar a cabo reacciones de *qPCR* utilizando los cebadores específicos adecuados (**Tabla 7**) y usando un programa que sigue el siguiente esquema común:

- 1.- Desnaturalización del ADN a 95°C durante 10 minutos.
- 2.- Desnaturalización del ADN a 95°C durante 30 segundos.
- 3.- Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante (IDT) durante 30 segundos.
- 4.- Polimerización del ADN a 72°C durante 20 segundos.
- 5.- Lectura de la fluorescencia.
- 6.- Repetición del paso 2 al 5, durante 40 ciclos.
- 7.- *Melting curve* o curva de fusión desde 60 a 95°C .

El volumen de la mezcla fue de 20 μl . Las mezclas de reacción contenían los cebadores necesarios para cada reacción a una concentración de $0,3 \mu\text{M}$ y 5 μl de *iTaq Universal SYBR Green Supermix* (Bio-Rad, EEUU).

Para la obtención del *fold change* se usaron al menos tres muestras biológicas con tres réplicas cada una en cada condición. Con todo ello se calculó el *fold change* usando el método $\Delta\Delta\text{C}_t$ (Pfaffl *et al.*, 2002c).

Los cebadores utilizados para ensayos de *qPCR* (**Tabla 7**) se diseñaron teniendo en cuenta que la longitud del amplicón estuviera comprendida entre 140 y 180 pb. Asimismo, para asegurar una eficiencia adecuada se eligieron amplicones que no mostrasen estructuras secundarias a la temperatura de apareamiento de los cebadores. Como ejemplo, a 55°C (temperatura de apareamiento de la mayoría de cebadores usados para *qPCR*), el dG debe ser superior (más positivo) a -8 kcal/mol .

En ambos casos, los cebadores se diseñaron manualmente o utilizando el programa informático ApE A Plasmid Editor (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape>), procurando que tuvieran las siguientes características:

- El porcentaje de G + C estuviera comprendido entre 55-65%.
- La temperatura de fusión (T_m) estuviera comprendida entre 55-65°C.
- El no auto-apareamiento de los cebadores.

Tabla 7. Cebadores utilizados en esta Tesis para ensayos de *qPCR* de genes de *S. fredii* HH103.

Nombre	Secuencia (5'-3')	pb	T_m (°C)
rt-16S-F2	GATACCCTGGTAGTCCAC	18	51
rt-16S-R2	TAAACCACATGCTCCACC	18	53
qnodA-F	CGTCATGTATCCGGTGCTGCA	21	61
qnodA-R	CGTTGGCGGCAGGTTGAGA	19	61
qnodD1-F	GCGAGCACGGACTGCGAA	18	61
qnodD1-R	CGGGAAAATGGGTTGCGGA	20	59
qttsI-F	CGGTTGGAAGATCAACTCTA	20	51
qttsI-R	GTCAATTCAAGAACGTAGCC	20	51
qnodD2-F	ACGCTAAAGCCCTCCATCGA	20	59
qnodD2-R	ATGGTGAAGTGCCAGTGGA	20	59
rt-nolR-F	CCAAAACGCCTGCTCATT	18	54
rt-nolR-R	ATTCTGGGCACGCAACTT	18	55
qsyrM-F	GTTCAATGACGATCTCTTGGT	21	54
qsyrM-R	ATTGCCATAGTTACCTTCGAC	21	54

Soluciones empleadas:

MOPS 4X	MOPS 80 mM, AcNa 20 mM, EDTA 4 mM
---------	-----------------------------------

Almacenar en oscuridad, el MOPS es sensible a la luz y al calor.

1.8.20.2. Medida de la actividad β -galactosidasa.

La determinación de la actividad β -galactosidasa se emplea para cuantificar la expresión de un gen cuando el promotor de dicho gen se fusiona con el gen *lacZ* o cuando se ha insertado un casete con una copia de *lacZ* carente de promotor dentro del gen en cuestión. Para medir esta actividad se sigue el método descrito por Miller (1972).

Se inocularon tubos con 3 mL de YM líquido a partir de cultivos bacterianos en fase exponencial y se incubaron hasta alcanzar una D.O.₆₆₀ entre 0,5 y 0,6.

Posteriormente se mezclaron en un tubo 200 μ L de cultivo, 800 μ L de tampón Z, 20 μ L de cloroformo y 10 μ L de SDS 0,1% (m/v). La mezcla se agitó mediante vórtex durante 15 segundos y se añadió 200 μ L de ONPG (orto-nitrofenil- β -d-galactopiranosido) preparado a 4 mg mL⁻¹ de tampón Z. Se agitó mediante vórtex y se incubó a 28°C en agitación mientras dura la inducción (hasta que la mezcla adquirió una coloración amarillenta). La reacción se detuvo añadiendo 500 μ L de Na₂CO₃ 1 M a esta. Por último, se cuantificó la D.O.₄₂₀ de cada tubo.

La actividad β -galactosidasa se calculó mediante la siguiente fórmula donde el tiempo es el transcurrido desde la adición del ONPG hasta que se detiene la reacción.

$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\text{Volumen final (mL)} \times \text{D.O.}_{420\text{nm}} \times 1000}{\text{Volumen del cultivo (mL)} \times \text{tiempo (min)} \times \text{D.O.}_{660\text{nm}}}$ <p>(Unidades Miller)</p>
--

Soluciones empleadas:

Tampón Z	16,68 g Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O; 6,24 g NaH ₂ PO ₄ H ₂ O; 0,75 g KCl; 0,25 g MgSO ₄ 7H ₂ O.
----------	---

Completar hasta 1L y ajustar el pH a 7,0.

1.8.20.3. RNA-seq.

Las estirpes a estudiar se crecieron a 28°C en medio YM, con o sin genisteína, hasta que alcanzaron la fase estacionaria (D.O.₆₀₀ de 1,2 aproximadamente). El ARN total se extrajo del mismo modo que se ha descrito en la sección 1.8.20.1 y posteriormente se verificó la calidad y la cantidad del ARN mediante un *Nanodrop* 1000 (Thermo

Scientific) y un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen). En total se extrajeron dos muestras independientes por cada condición.

El ARN ribosómico (ARNr) se eliminó usando el kit *MICROB Express Bacterial mRNA Purification* (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de eliminar el ARNr, se comprobó la integridad y la calidad del ARN mediante Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). La secuenciación del ARN se llevó a cabo por la empresa Sistemas Genómicos (https://www.sistemasgenomicos.com/web_sg/), mediante el uso de la tecnología Next Generation Sequence (NGS) platform Illumina y el secuenciador Illumina HiSeq 2000 (Illumina). Las muestras de ARN empobrecidas en ARNr se usaron para generar librerías completas del transcriptoma siguiendo las instrucciones del fabricante para la secuenciación mediante la plataforma NGS. La calidad del ADNc se analizó mediante el kit *Bioanalyzer 2100 DNA 1000* (Agilent Technologies) y se cuantificó usando un fluorómetro Qubit 2.0 (Invitrogen).

Las lecturas obtenidas por secuenciación del transcriptoma completo se mapearon frente a la última versión del genoma de *S. fredii* HH103 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000283895.1/) usando el algoritmo *Life Technologies mapping algorithm* versión 1.3 (<http://www.lifetechnologies.com/>). Las lecturas de baja calidad se eliminaron usando el software *Picard Tools* version 1.83.

La predicción génica se estimó usando el método *cufflinks* (Trapnell *et al.*, 2010) y los niveles de expresión se calcularon usando el software *htseq*, versión 0.5.4p3 (Anders y Huber, 2010). Este método elimina las lecturas multi-mapeadas, considerando para la expresión génica solamente las lecturas únicas. El método *edge* versión 3.2.4 se aplicó para el análisis de la expresión diferencial entre las condiciones (Robinson *et al.*, 2010). Este método usa un modelo de *Poisson* para estimar la varianza de los datos de RNAseq para la expresión diferencial, y depende de diferentes procesos de normalización basados en la rigidez de las muestras, la composición en GC y la longitud de los genes. Los genes diferencialmente expresados se definieron como aquellos genes con un *fold change* menor y mayor que -3 ó 3 respectivamente, y con un valor de *p* inferior a 0,05.

2. Materiales y métodos utilizados para los estudios con plantas.

2.1. Plantas.

Las plantas empleadas en esta Tesis están recogidas en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Plantas utilizadas en esta Tesis.

Especie	Variedad	Nombre común
<i>Glycine max</i> L. Merrill	Williams	Soja (<i>soybean</i>)
<i>Vigna unguiculata</i>	Bisbee Red	Caupí (<i>cowpea</i>)
<i>Lotus burttii</i>	Borsos	
<i>Lotus japonicus</i>	Gifu	
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>		

2.2. Soluciones nutritivas para las plantas.

Para el crecimiento de las plantas se utilizó la solución de Fåhraeus carente de nitrógeno combinado.

Solución de Fåhraeus (Vincent, 1970)

CaCl ₂ 2H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,12 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O/Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	0,15 g/0,075 g
Citrato férrico*	1 mL
Solución de Gibson*	1 mL
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C). Es importante añadir primero la solución de Gibson y el citrato férrico y después añadir uno a uno el resto de componentes esperando siempre a que se disuelva antes de añadir el siguiente.

Solución de micronutrientes de Gibson*

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ H ₂ O	2,08 g
ZnSO ₄ 7 H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,08 g
Na ₂ MoO ₄	0,13 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1 L

*El citrato férrico se preparó disolviendo con calor 5g L⁻¹ de citrato férrico en H₂O destilada.

2.3. Desinfección y germinación de semillas.

Las semillas de *G. max*, *V. unguiculata* y *G. uralensis* se desinfectaron mediante un tratamiento con etanol 96° durante 30 segundos, seguido de otro con hipoclorito sódico al 12% (m/v) durante 6 minutos. Tras ello, las semillas se lavaron seis veces con abundante agua destilada estéril. Las semillas de *G. uralensis* se escarificaron con ácido sulfúrico 96-98% durante 10 minutos antes de su desinfección. Las semillas de *L. burttii*

y *L. japonicus* Gifu se desinfectaron de igual forma que *G. uralensis*, pero usando una concentración del hipoclorito sódico del 6%.

Las semillas desinfectadas se colocaron en placas de Petri que contenían agar-agua al 1% (m/v) y se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente o a 28°C hasta su germinación. Las semillas de *L. burttii* y *L. japonicus* Gifu se mantuvieron 1 hora en agua de imbibición y posteriormente se colocaron en las placas de Petri.

2.4. Inoculación y cultivo de plantas.

Las semillas germinadas se transfirieron a diferentes sistemas según el experimento realizado.

2.4.1. Jarro de Leonard (Vincent, 1970).

El sistema consiste en un depósito de ~1,5 L que contiene solución de Fåhreaus. Sobre este depósito se colocó una maceta que contiene 800 cm³ de vermiculita mezclada con perlita [vermiculita:perlita (3:1)] y humedecidas con 250 mL de la misma solución nutritiva. La maceta y el depósito se conectaron mediante una mecha de algodón de aproximadamente 20 cm de longitud. El jarro completo se esterilizó en autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C). En cada jarro se colocaron dos semillas (en el caso de soja y caupí). En el caso de *G. uralensis*, *L. japonicus* Gifu y *L. burttii* los ensayos de nodulación se realizaron en minijarros Leonard (aproximadamente 200 cm³ de vermiculita:perlita en la parte superior y un depósito de ~200 mL que contenía la solución nutritiva). En cada jarro se colocaron 4 semillas tanto para *G. uralensis* como *L. burttii* como para *L. japonicus* Gifu. Cada semilla se inoculó con 1 mL de cultivo bacteriano crecido en medio YM y con una D.O.₆₀₀ de 0,4-0,5.

2.4.2. Sistema de hidroponía en vaso de precipitado.

Alrededor de 6 semillas de *G. max* se colocaron sobre una rejilla que descansa sobre un depósito que contenía 150 mL de solución Fåhreaus 1X y 15 mL de un cultivo bacteriano crecido en medio YM a una D.O.₆₀₀ de alrededor de 0,5. Este sistema se encuentra en el interior de un vaso de precipitado de cristal de 2 L con tapa de cristal que contenía 100 mL de agua destilada estéril, para favorecer condiciones de alta humedad. Todos los componentes del sistema fueron esterilizados en autoclave (20 minutos a 121°C a una atmósfera de sobrepresión).

2.5. Ensayos de nodulación.

Estos ensayos se realizaron para analizar las propiedades simbióticas de las distintas estirpes estudiadas en esta Tesis. Se llevaron a cabo en cámaras de plantas con un fotoperíodo de 16 horas de luz (con intensidad de $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad a 26°C y 18°C , respectivamente. En los ensayos con las plantas de soja y caupí, se mantuvieron en la cámara de plantas durante 6 semanas, y entre 6 y 9 semanas para *Lotus* y *Glycyrrhiza*.

2.5.1. Recuento del número de nódulos y estimación de su peso.

Para determinar la eficiencia de nodulación se cuantificó el número de nódulos formados en cada planta. Estos nódulos se recolectaron y se pesaron en conjunto para estimar el peso individual de cada nódulo.

2.5.2. Estimación de la actividad nitrogenasa.

Para ello se usó la Técnica de la Reducción del Acetileno (ARA, del inglés *Acetylene Reduction Assay*), empleándose un cromatógrafo de gases 5890A (Hewlett Packard). Esta técnica permite realizar una medida de la capacidad de la enzima nitrogenasa para reducir el acetileno a etileno, la cual es una medida indirecta de la fijación biológica del nitrógeno (Turner y Gibson, 1980).

Para llevar a cabo esta medida, la raíz de cada planta se separó de la parte aérea y rápidamente se introdujo en un frasco de 250 mL, para *G. max*, o en un tubo de 10 mL, para *L. burtii*, y se selló con un tapón de goma. Con una jeringa se extrajo la décima parte del volumen de aire del recipiente y se introdujo el mismo volumen de acetileno. Transcurrida 1 hora, se extrajo 1 muestra de 1 mL de la atmósfera de cada frasco y se analizaron en el cromatógrafo de gases. Por último, se determinó la actividad nitrogenasa de cada raíz, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{ARA (nanomoles etileno/} \frac{\text{Área de etileno x vol. recipiente (mL)}}{\text{planta x hora)} \text{)} = \frac{\text{Área 1nmol etileno x tiempo (horas)}}{\text{Área 1nmol etileno x tiempo (horas)}}$$

2.5.3. Secado de la parte aérea de la planta.

Las partes aéreas de las plantas se secaron en una estufa para desecación (J.P. Selecta) a 80°C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se dejaron otras 24 horas con el horno apagado y ventilación cerrada, para evitar su rehidratación y por último se pesaron.

2.6. Ensayos de adhesión-colonización en plantas de soja.

El cultivo de plantas de soja se realizó usando el sistema de hidroponía en vaso de precipitado descrito en el apartado 2.4.2. Las semillas ya germinadas se colocaron en las rejillas y se inocularon con 15 mL de cultivo bacteriano crecido en medio YM con una D.O._{600nm} de 0,5-0,6 y se pasaron a la cámara de cultivo de plantas donde estuvieron 3 días con una emisión de intensidad lumínica de $500 \mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ ($\lambda = 400 - 700 \text{ nm}$), fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura de 24/18 °C - día/noche y humedad relativa de un 50%. Transcurrido este tiempo se determinó el número de bacterias adheridas a las raíces siguiendo la metodología descrita en Jiménez-Guerrero *et al.*, (2015). Los dos primeros centímetros de cada raíz principal se cortaron por la región proximal, se lavaron separadas 3 veces con 35 mL de agua desionizada estéril y se introdujeron en un tubo *ependorf* de 1,5 mL que contenía 1 mL agua desionizada estéril. Posteriormente, se procedió a la liberación de las bacterias íntimamente asociadas a la raíz mediante sonicación (2 x 1 minuto) en un baño de ultrasonido. Las bacterias liberadas se cuantificaron mediante recuento en placa de las colonias aparecidas tras sembrar diluciones seriadas de agua desionizada estéril en tubos *ependorf* hasta 10^4 . La siembra se realizó en placas de TY con los antibióticos adecuados dependiendo de la estirpe y cicloheximida para prevenir la aparición de hongos. Los valores obtenidos se expresaron en UFC (unidades formadoras de colonias) por cm de la raíz.

2.7. Microscopía óptica.

Para los estudios de microscopía óptica en soja, pequeños fragmentos de nódulos (6 semanas después de la inoculación) se fijaron inmediatamente en glutaraldehído 4 % (v/v) en tampón calcodilato 0,1 M, pH 7,2 durante 2h a 4°C después de su recolección. Las muestras se lavaron varias veces con tampón calcodilato 0,1 M, pH 7,2, se deshidrataron progresivamente en concentraciones crecientes de acetona y se incluyeron en resina Spurr (kit de inclusión baja viscosidad, del Dr. Spurr). Se obtuvieron secciones finas (1 μm) utilizando un ultramicrotomo Leica EM UC7, se tiñeron con azul de toluidina y se observaron en el microscopio óptico Olympus BX6.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo I. Estudio de la relevancia simbiótica de genes pertenecientes al regulón *nod* de *S. fredii* HH103 previamente no caracterizados: psfHH103d_208 y psfHH103d_448.

1. Introducción.

Tras la secuenciación del genoma y el análisis del transcriptoma de *S. fredii* HH103 en presencia y ausencia de genisteína (Vinardell *et al.*, 2015; Pérez Montaña *et al.*, 2016b), se identificaron un total de 100 genes diferencialmente expresados en presencia de este flavonoide: 92 inducidos y 8 reprimidos. Muchos de estos genes no han sido estudiados en *S. fredii* HH103, y la mayoría tampoco en otros rizobios. En base a su regulación, estos 100 genes pueden dividirse en tres grupos:

- a) Genes dependientes de *nod boxes* (NB): existen 11 NB activas que afectan a 35 genes, todos ellos situados en el pSym y regulados positivamente por NodD1.
- b) Genes dependientes de *tts boxes* (TB): 35 genes regulados positivamente por NodD1 y TtsI. Son los genes que codifican el T3SS y los efectores secretados.
- c) Genes independientes de NB y TB: 30 genes, 11 en el pSym, 15 en el cromosoma y 4 en el plásmido e.

En este primer capítulo de la Tesis se ha abordado el estudio inicial de dos de los genes pertenecientes al primer grupo: psfHH103d_448 y psfHH103d_208. Los estudios realizados se han limitado al análisis *in silico* de estos genes y al de su relevancia en la interacción simbiótica con soja.

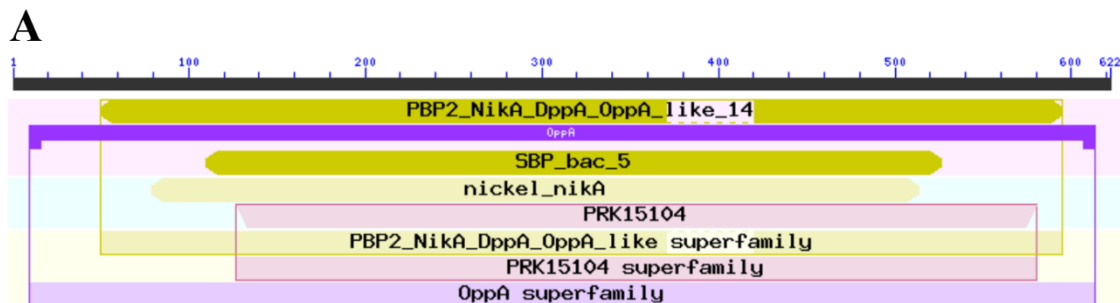
2. Resultados.

2.1. Caracterización *in silico* de los genes psfHH103d_208 y psfHH103d_448 de *S. fredii* HH103.

Los genes psfHH103d_448 y psfHH103d_208 se localizan en el pSym y pertenecen al grupo de genes diferencialmente expresados en presencia de genisteína que están precedidos por una *nod box* y se inducen por flavonoides y NodD1.

El gen psfHH103d_208 está precedido por la NB17 y codifica una proteína de 622 aminoácidos (~69 kDa). La búsqueda en la base de datos mediante *Blastp* y usando la secuencia polipeptídica (a partir de ahora, d_208) reveló que contiene un dominio OppA (*accession number* COG4166), lo que sugiere que es la proteína periplásmica encargada de captar un determinado sustrato (en este caso, oligopéptidos), y transferirla a un

transportador de tipo ABC (del inglés *ATP-binding cassette*) (**Figura 13**). Así mismo, se identificaron otros dos transportadores con dominio OppA, cuyas secuencias peptídicas presentan una identidad del 99% y del 33%, respectivamente, con la del polipéptido codificado por d_208. Los transportadores de tipo ABC son un grupo de proteínas transportadoras de membrana que realizan transporte activo de diversas moléculas como azúcares, aminoácidos, oligopéptidos, etc., y cada microorganismo posee una batería de ellos para captar nutrientes del ambiente exterior (Jones y George, 2013). Esta familia de transportadores está presente no sólo en bacterias, sino también en eucariotas superiores, incluyendo los mamíferos. De la información actual de los genomas microbianos, los transportadores ABC representan la mayor familia proteica conocida hasta la fecha, y entre el 1 y 3% del genoma de bacterias y arqueas codifican para subunidades de estos transportadores (Tomii y Kanehisa, 1998). Los transportadores ABC conocidos hasta ahora se agrupan en exportadores e importadores, dividiéndose estos últimos en dos clases (I y II), dependiendo de su estructura y su mecanismo (Holland y Blight, 1999; ter Beek *et al.*, 2014). Típicamente, un transportador ABC presenta en su estructura 2 dominios NBD (*nucleotide-binding domains*, NBD1, NBD2) y dos dominios TMD (*transmembrane domains*, TMD1, TMD2).



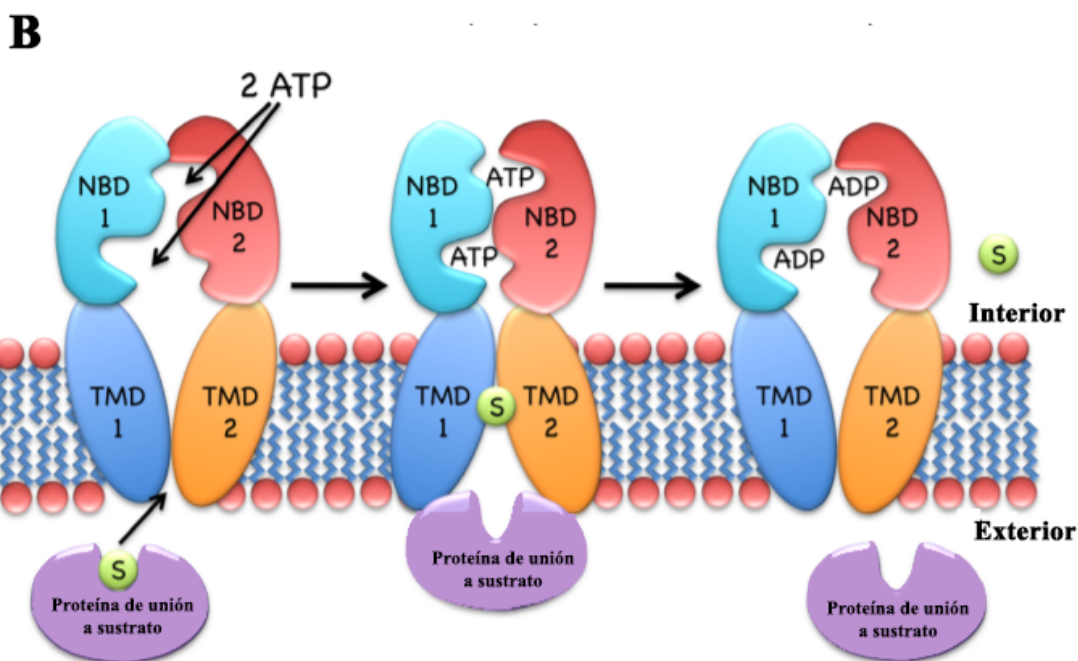


Figura 13. (A) Representación de los dominios conservados de *d_208* que incluye el dominio OppA. (B) Esquema del mecanismo de funcionamiento de un transportador tipo ABC. S: sustrato. NBD: dominio de unión a nucleótido. TMD: dominio transmembrana. Figura adaptada de Wilkens, 2015.

Estos transportadores bombean los sustratos a transportar contra un gradiente químico, un proceso que requiere la hidrólisis de ATP como fuerza impulsora. En condiciones fisiológicas, los transportadores ABC operan en una sola dirección (importación o exportación) (Wilkens, 2015). Tanto los importadores como los exportadores utilizan el mismo mecanismo, siendo la afinidad por el sustrato en cada una de las dos conformaciones lo que determina la dirección de transporte (Rees *et al.*, 2009). Los transportadores ABC bacterianos son esenciales para la supervivencia de la célula, la virulencia y la patogenicidad (Davidson *et al.*, 2008), y también preservan la integridad de la célula ante cambios que puedan afectarla. Por ejemplo, la activación de ciertos transportadores sensibles a la presión osmótica neutraliza los cambios potencialmente letales en la concentración de solutos en la célula mediante la absorción de iones (Poolman *et al.*, 2004). El análisis comparativo de la secuencia de aminoácidos de *d_208* frente a otros rizobios reveló que comparte un 100% de identidad con las proteínas ortólogas de *S. fredii* USDA257, *S. fredii* USDA205 y *S. sp.* CCBAU05631, un 99% de identidad con la de *S. fredii* NGR234 y un 68% de identidad con la de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM2297. Además, *d_208* tiene una identidad de un 73,2% con el ortólogo presente en *Mycoplana dimorpha*, un rizobio que pertenece a la familia *Brucellaceae*.

El gen psfHH103d_448 codifica una proteína de 269 aminoácidos (~29,9 kDa) y su expresión está regulada por la NB13. Esta proteína (a partir de ahora d_448) no está presente en otros rizobios, ni siquiera en otras estirpes de *S. fredii* en las que sólo se encuentran pequeños segmentos parcialmente idénticos a esta proteína, por lo que parece ser exclusiva de HH103. La proteína d_448 contiene un dominio de recepción de señal (REC) típico del elemento fosforilable de un sistema regulador de dos componentes. Los sistemas reguladores de dos componentes son sistemas biológicos de señalización en los que una proteína histidina quinasa (HK), en respuesta a un estímulo normalmente externo, se autofosforila en un residuo de histidina (His) para después transferir esa señal química a un residuo de aspártico presente en otra proteína, llamada proteína reguladora de respuesta (RR), en un dominio conservado denominado receptor (DR o REC, del inglés *receiver*) (Stock *et al.*, 2000; Cheung y Hendrickson, 2010). La proteína RR, en su estado fosforilado, se une a regiones promotoras de determinados genes mediante el dominio efector, que generalmente es un dominio de unión a ADN, activando o reprimiendo la transcripción de los mismos (Stock *et al.*, 2000). Como resultado de este cambio en la expresión génica, las células modifican ciertas características que le permiten adaptarse a las nuevas condiciones ambientales. Eventualmente, las condiciones del medio volverán a cambiar, y la señal activadora del sistema en cuestión estará ausente. Bajo estas circunstancias, la HK dejará de estar activa como quinasa, y la proteína RR fosforilada (RR-P) perderá el grupo ~P, inactivándose como regulador transcripcional (Stock *et al.*, 2000; Kenney, 2010).

La búsqueda en la base de datos mediante *Blastp* usando la secuencia polipeptídica de d_448 reveló que este polipéptido pertenece a la superfamilia PhoB (*accession number* TIGR02154) y contiene un dominio REC (*accession number* cd00156). En la **Figura 14**, se muestra el alineamiento del polipéptido d_448 con las proteínas PhoB de diversos rizobios, incluyendo la de HH103. Como se muestra en dicha figura, d_448 presenta tanto el residuo de aspártico fosforilable como los residuos que conforman el sitio de dimerización típico de estas proteínas. Sin embargo, a diferencia de las proteínas PhoB, d_448 carece de un dominio conservado de unión a ADN.

psfhh103d_448	MNDERNYRSISRSPGTTRLDLAEGRTVASPRRRDRICVRLSRAGLGSRPDGHMQNGSRYW	60
phoBBj	-----	0
phoBNGR	-----	0
phoBHH	-----	0
phoBSm	-----	0
psfhh103d_448	NNSNVAGSAPVCAVAGLPRRGPEYPRRVVTDTPDGGREGISPIKLGETTIIIDLHGQGLS	120
phoBBj	-----MGARIMVVE-----DEEAL-----TELLRYNLEGGDYD	28

2.3. Fenotipo simbiótico de los mutantes en los genes psfHH103d_208 y psfHH103d_448 de *S. fredii* HH103 en soja.

El fenotipo simbiótico de los mutantes en los genes d_208 y d_448 se estudió en la planta hospedadora *Glycine max* cv. Williams (soja). Para ello se inocularon plantas de soja con estos mutantes y con la estirpe parental y, tras 42 días, se analizaron tres parámetros: peso seco de la parte aérea, número de nódulos y el peso fresco de éstos (Tabla 9, Figura 15). Como control negativo, se usaron plantas de soja sin inocular.

La inactivación del gen d_448, provocó cambios en la capacidad simbiótica de *S. fredii* HH103 en soja, de modo que las plantas inoculadas con este mutante mostraron un número y un peso fresco de nódulos significativamente mayores que los mostrados por las plantas inoculadas con la estirpe parental (Tabla 9; Figura 15A, B). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea entre las plantas inoculadas con SVQ777 y HH103 Rif^R (Tabla 9; Figura 15C). Por otro lado, no hubo diferencias significativas en el número de nódulos y el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con el mutante en el gen d_208 y la estirpe parental (Tabla 9; Figura 15A, C), pero sí en el peso fresco de los nódulos, teniendo mayor tamaño los nódulos que provenían de plantas inoculadas con el mutante en el gen d_208 (Tabla 9; Figura 15B).

Tabla 9. Respuesta de *G. max* cv. Williams a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados d_208 (SVQ776) y d_448 (SVQ777) ^{a, b}.

Inoculante (gen mutado)	Peso seco parte aérea (g) ^c	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)
HH103 Rif ^R	2,2±0,2	48,0±4,6	708,1±69,6
SVQ776 (d_208)	2,7±0,2	50,9±4,2	1111,7±96,6*
SVQ777 (d_448)	2,8±0,3	68,6±6,1*	1174,0±114,2*

^a Los datos representan la media de 4-5 jarros con 2 plantas por cada jarro. Los nódulos y la parte aérea se recogieron a los 42 dpi (días post-inoculación). Cada mutante se comparó con la estirpe parental HH103 usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota diferencias significativas con un nivel de $\alpha=5\%$.

^b Los datos mostrados se obtuvieron de un único ensayo de nodulación.

^c El peso seco de la parte aérea de las plantas no inoculadas fue de 0,67±0,06 g.

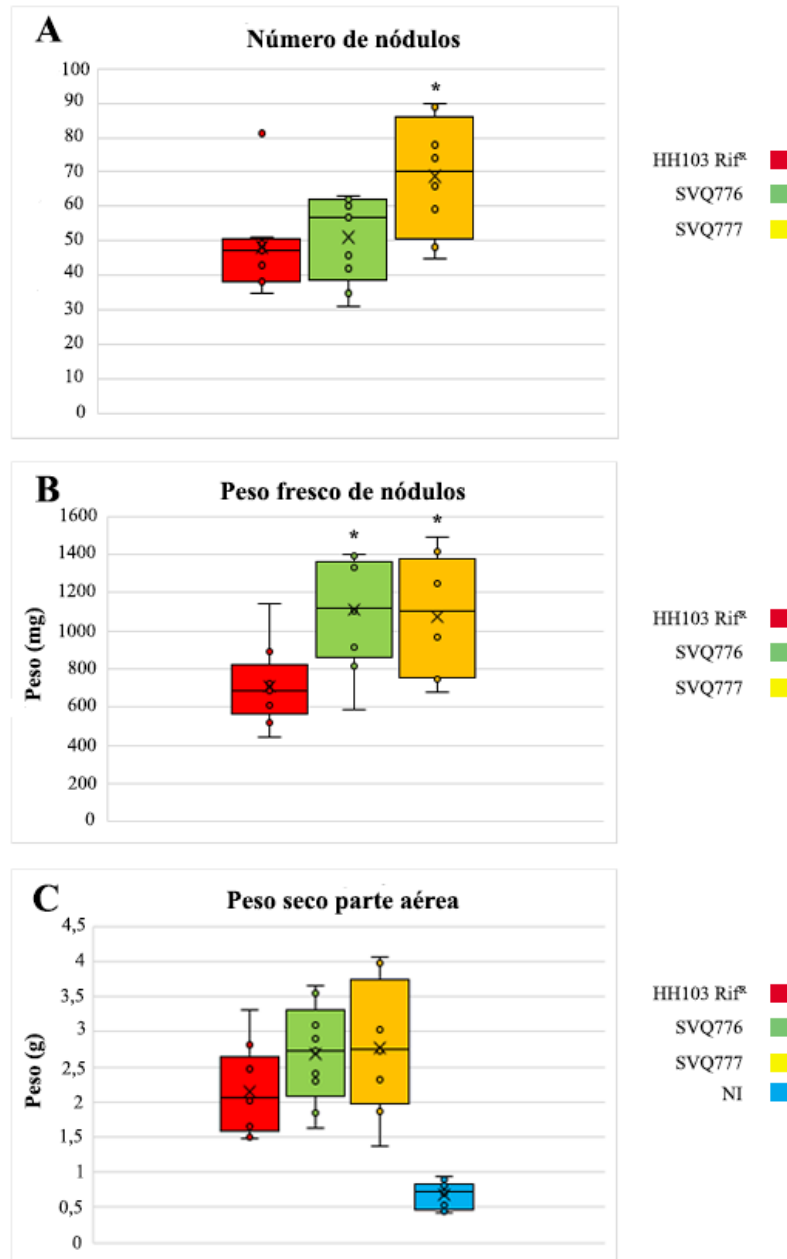


Figura 15. Fenotipo simbiótico de *S. fredii* HH103 y sus derivados SVQ776 (d_208) y SVQ777 (d_448). Las barras indican el valor máximo y mínimo de los datos representados. Los círculos son cada uno de los datos representados y la “X” la media de estos datos. La línea del interior de la caja es la mediana. La presencia de un asterisco denota diferencias significativas con respecto a la estirpe parental con un nivel de $\alpha=5\%$.

Ya que la inactivación del gen d_448 provoca un aumento en el número y peso fresco de nódulos en soja, pero no en el peso seco de la parte aérea de las plantas, decidimos analizar si existían diferencias en la invasión de las células simbióticas de los nódulos con respecto a la estirpe parental. Los estudios microscópicos realizados muestran que ambas estirpes infectan de manera similar los nódulos de soja y las células vegetales están invadidas con cantidades similares de bacteroides (apreciación visual) (**Figura 16**).

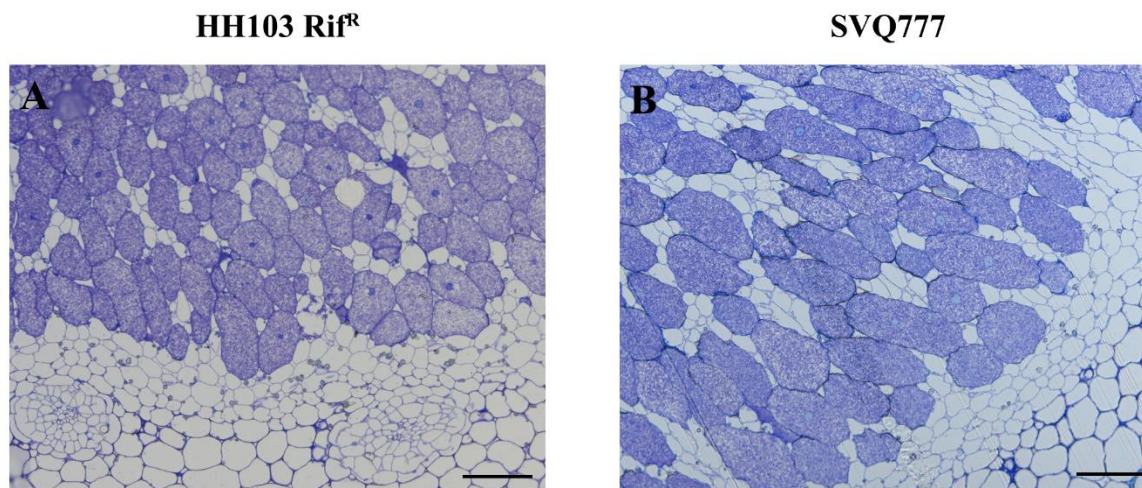


Figura 16. La inactivación de d_448 no afecta a la capacidad de *S. fredii* HH103 de invadir nódulos de soja. Microscopía óptica de nódulos inducidos en *G. max* cv. Williams por (A) *S. fredii* HH103 (wt) y (B) el mutante SVQ777 (d_448). Las barras se corresponden con 50 μ m.

3. Discusión.

Los transportadores ABC son una familia de proteínas de membrana que median diversos procesos de transporte impulsados por ATP. En *Bradyrhizobium diazoefficiens*, después de la inducción con exudados de soja, se observa un aumento del número de proteínas de transporte ABC que se expresan diferencialmente, la mayoría de ellas implicadas en el transporte de aminoácidos y carbohidratos (Liu *et al.*, 2017). En *S. meliloti*, el gen *bacA* codifica un transportador ABC esencial para el desarrollo del bacteroide, protegiéndolo de los efectos bactericidas de los péptidos ricos en cisteínas específicos de nódulos (NCRs, del inglés *nodule-specific cysteine-rich*) (Mergaert *et al.*, 2003; Haag *et al.*, 2012) durante la simbiosis con plantas leguminosas pertenecientes al clado carente de repetición-invertida (IRLC, del inglés *inverted repeat-lacking clade*) (Haag *et al.*, 2011a).

El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de d_208 revela que pertenece a la familia de los transportadores periplásmicos tipo ABC con un dominio presente en la superfamilia OppA. OppA es una lipoproteína que forma parte de un sistema de transporte de permeasas de oligopéptidos bacterianos (*oligopeptide permease*, Opp) responsable de la importación de oligopéptidos en la célula (Wium *et al.*, 2015). Esta proteína constituye el dominio extracelular de unión al sustrato de este sistema transportador. La mutación de d_208 no altera la capacidad simbiótica de *S. fredii* HH103 con *G. max.*, lo que sugiere que este gen no desempeña una función decisiva en esta pareja simbiótica a pesar de que

su expresión esté directamente controlada por flavonoides y NodD1. En base a esto, cabe preguntarse si este gen podría desempeñar su función como transportador en unas condiciones diferentes a las estudiadas en esta Tesis o con otra planta hospedadora, o si quizás, es lo único que queda de un sistema transportador de membrana ancestral presente en otros organismos, y que no cumple ninguna función en HH103. Otra alternativa es que sea un transportador redundante y que haya otros que puedan suplir su función.

La proteína d_448 podría pertenecer a un sistema regulador de dos componentes ya que contiene un dominio de recepción de señal (REC). El análisis *in silico* de la secuencia aminoacídica de esta proteína reveló que d_448 pertenece a la superfamilia PhoB. La proteína PhoB es una proteína reguladora de la respuesta de unión al ADN que actúa con PhoR en un sistema de 2 componentes que responde al ion fosfato. Por ejemplo, en *E. coli* el sistema PhoR-PhoB controla el regulón Pho, que consta de hasta 137 genes que se inducen o reprimen por falta de fosfato (Geiger *et al.*, 2002). El gen d_448 debe codificar la proteína RR de este sistema de dos componentes ya que en su secuencia de aminoácidos encontramos un residuo de aspártico que también está presente en el sitio de fosforilación de la proteína PhoB de otros rizobios. De manera general, PhoB en su estado fosforilado, se une a regiones promotoras de determinados genes mediante un dominio de unión a ADN, activando o reprimiendo la transcripción de los mismos (Stock *et al.*, 2000). Este dominio de unión a ADN no está presente en d_448 lo que nos lleva a preguntarnos si quizás nuestra proteína actúa como una quinasa intermedia cuya función es transferir el grupo fosforilo del residuo conservado de aspártico a otra proteína receptora cuyo dominio efector será el que modifique la expresión génica o si d_448 sí se une al ADN, pero a través de un dominio no caracterizado hasta la fecha. Es necesario estudiar más en profundidad el papel que puede desempeñar la proteína d_448 en *S. fredii* HH103.

El por qué d_448 sólo está presente en HH103 entre los rizobios cuya secuencia está disponible es un hecho interesante, al igual que el hecho de que la mutación en este gen parece afectar ligeramente la capacidad de nodular soja con respecto a la estirpe parental, lo que sugiere una importancia en simbiosis. Será necesario realizar más estudios con diferentes plantas hospedadoras para intentar vislumbrar la posible función de dicho gen en simbiosis. Asimismo, sería interesante estudiar características del estado en vida libre pero importantes para el establecimiento de la simbiosis como la producción de polisacáridos, la capacidad de formar biopelículas y la movilidad tanto *swimming* como en superficie. Finalmente, si d_448 forma parte de un sistema de dos componentes,

debería averiguarse cuál es el otro componente de este posible sistema regulador, lo que quizás ayudaría a entender los posibles fenómenos regulados.

Capítulo II. Caracterización simbiótica de genes relacionados con la producción de hopanoides.

1. Introducción.

Como se ha descrito previamente, se han identificado tres grupos de genes en base a su expresión en presencia y ausencia de genisteína. En el pSym se localiza un grupo de 5 genes cuya expresión está regulada por NodD1 y genisteína a través de la NB1: psfHH103d_373, psfHH103d_372, psfHH103d_371, psfHH103d_371.5 (*hpnD*) y psfHH103d_370 (*shc*). En este capítulo se abordan los estudios iniciales de este grupo de genes.

2. Resultados.

2.1. Estudios *in silico* de los genes psfHH103d_373, psfHH103d_372, psfHH103d_371.5, psfHH103d_371 y psfHH103d_370 de *S. fredii* HH103.

psfHH103d_373 (de aquí en adelante d_373) es el primer gen de este grupo de genes. Presenta una longitud de 525 pb y codifica una proteína de 174 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de factores de transporte nuclear de clase 2 (*accession number* cl09109). El gen d_373 tiene dos posibles dominios de función, en principio, muy distinta. Por un lado, un dominio cetoesteroide isomerasa cuya función es catalizar la isomerización de delta-5-3-cetoesteroide a delta-4-3-cetoesteroide, por transferencia intramolecular del protón del C4 a la posición del C6. Por otro lado, un dominio que pertenece a la superfamilia de factores de transporte nuclear de clase 2 (NTF2, del inglés *nuclear transport factor 2*) (**Figura 17**). Su función es desconocida y tiene un 100 % de identidad con las proteínas AB395_00004521 de *S. fredii* CCBAU45436 y AOX55_00004539 de *S. fredii* CCBAU25509, pero no se encuentran ortólogos de este gen en el resto de estirpes de *S. fredii* cuyos genomas han sido secuenciados. Existen otras proteínas que presentan una cierta identidad con d_373 en otras α -proteobacterias, pero con una longitud mucho menor que la presente en HH103.

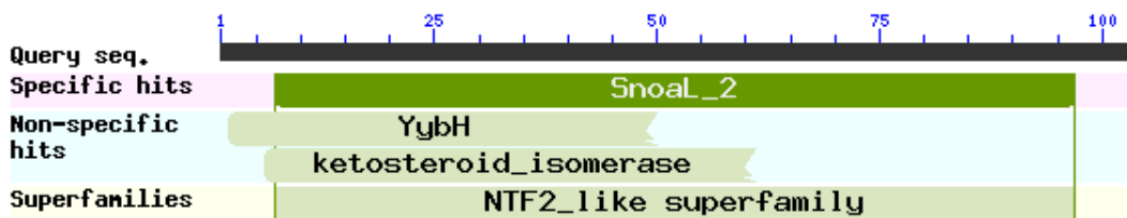


Figura 17. Representación de los dominios conservados de d_373.

psfHH103d_372 (a partir de ahora d_372) codifica una proteína de 281 aminoácidos (también llamada HpnC en otras estirpes de *Sinorhizobium*) que tiene un 100 %, 97 % y 99 % de identidad con las proteínas escualeno/fitoeno sintasa (*accession number* pfam00494) presentes en *S. fredii* USDA257, NGR243 y en algunas estirpes de *S. fredii* CCBAU respectivamente. HpnC también está en bacterias del género *Bradyrhizobium* con una identidad de entre un 80-70 %. Por ejemplo, en *Bradyrhizobium icense* (80 %), *Bradyrhizobium elkanii* (72 %) y *B. diazoefficiens* (70 %). En *B. japonicum* el gen *hpnC* codifica una escualeno sintasa que junto con la proteína HpnD podrían catalizar la condensación de las unidades de un isoprenoide fosforilado en la formación del escualeno, el precursor lineal de los hopanoides (Perzl *et al.*, 1998). Además, la proteína d_372 tiene estructuralmente un 100 % de identidad con un 91% de cobertura con la proteína fitoeno sintasa de *Enterococcus hirae*.

El gen psfHH103d_371.5 o *hpnD* de HH103 codifica una proteína de 278 aminoácidos, HpnD, que pertenece a la familia de las escualeno/fitoeno sintasas (*accession number* pfam00494). HpnD está presente en *S. fredii* USDA257, *S. fredii* NGR234 (100 % identidad; 100 % y 99 % cobertura, respectivamente) y en varias especies del género *Bradyrhizobium* como *B. elkanii* (100 % identidad, 77 % cobertura), *B. icense* (98 % identidad, 80 % cobertura) y *B. diazoefficiens* (97 % identidad, 78 % cobertura). Su estructura es 100 % idéntica con un 96% de cobertura a la de la proteína dehidroescualeno sintasa de *Enterococcus hirae*.

psfHH103d_371 (a partir de ahora d_371) es un gen de 1308 pb y codifica una proteína de unión a NAD(P) de 435 aminoácidos que pertenece a la superfamilia HpnE (*accession number* TIGR03467). Los genes de esta familia están generalmente en el mismo *locus* que los genes involucrados en la biosíntesis y formación del escualeno, que es el producto inmediato de la condensación del farnesil pirofosfato. Se han encontrado proteínas de unión a NAD(P) con una alta identidad con d_371 en muchas especies del género *Bradyrhizobium*.

psfHH103d_370 o *shc* de HH103 es un gen de 2028 pb que codifica una escualeno hopano ciclase (SHC) de 675 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de las hopano ciclasas (*accession number* cd02892) y que tiene un 99 % de identidad y un 95 % de cobertura con la proteína Shc presente en *S. fredii* USDA257, *S. fredii* NGR234, *S. fredii* CCBAU 83666 y *Sinorhizobium* sp. CCBAU 05631. Shc es una proteína integral de membrana esencial en la síntesis de hopanoides cuya función es ciclar el escualeno (**Tabla 10; Figura 18**).

En *Bradyrhizobium*, estos genes no están bajo el control de una NB y, por tanto, no se inducen por flavonoides y NodD. Estudios recientes muestran que la inactivación de estos genes en *Bradyrhizobium* sp. y *B. diazoefficiens* afecta negativamente tanto a la supervivencia bacteriana en condiciones estresantes como al rendimiento simbiótico con sus leguminosas huésped (Silipo *et al.*, 2014; Kulkarni *et al.*, 2015). Puesto que en *S. fredii* HH103 estos genes se inducen por flavonoides y de una manera dependiente de NodD1, nos preguntamos si los hopanoides podrían tener un papel protector bacteriano durante la simbiosis.

Tabla 10. Presencia y porcentaje de identidad de las proteínas d_373 a d_370 de *S. fredii* HH103 en otros rizobios.

	<i>S. fredii</i> HH103				
	d_373	d_372	d_371.5	d_371	d_370
<i>S. fredii</i> USDA257	-	Escualeno /fitoeno sintasa (100 %)	Fitoeno sintasa (100 %)	y4aB; proteína de unión a NAD(P) (99 %)	Shc (99 %)
<i>S. fredii</i> NGR234	-	Fitoeno sintasa (97 %)	Escualeno sintasa; HpnD (98 %)	Flavoproteína oxidorreductasa (97 %)	Escualeno hopano ciclase (99 %)
<i>B.</i> <i>diazoefficiens</i>	-	Escualeno sintasa; HpnC (69 %)	Escualeno sintasa; HpnD (77 %)	Oxidorreductasa; HpnE (75 %)	Escualeno hopano sintasa; Shc (78 %)

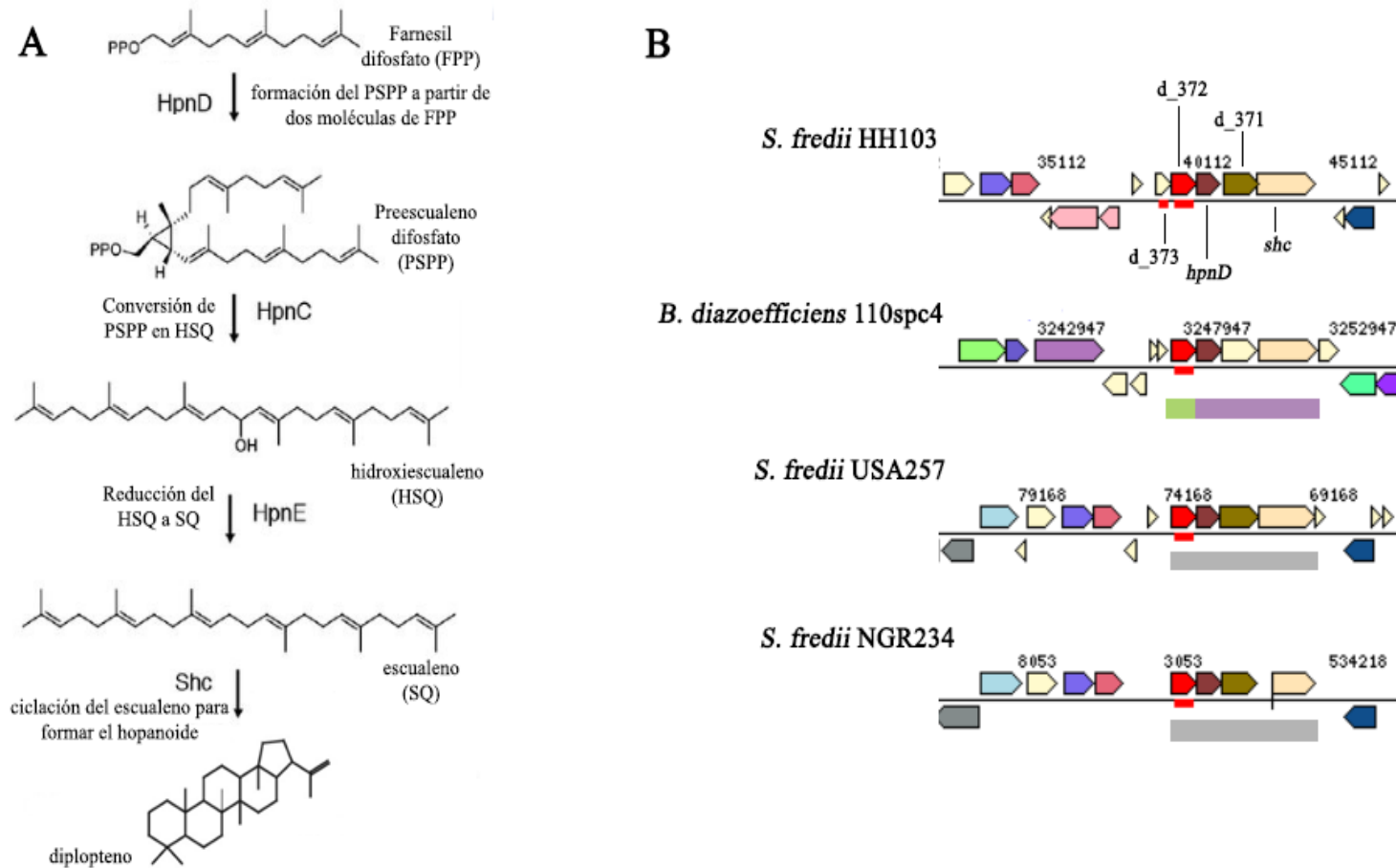


Figura 18. (A) La biosíntesis de hopanoides tiene lugar a través de múltiples pasos catalizados por los productos de los genes *hpn*. Figura adaptada de Brenac *et al.* (2019). (B) Organización génica de *d_373* a *d_370* en *S. fredii* HH103, *S. fredii* NGR234, *S. fredii* USDA257 y *B. diazoefficiens* 110spc4. Delante de estos genes existe una NB activa en las tres estirpes de *S. fredii* mostradas. Rectángulo gris: identidad 100-90 %. Rectángulo morado: identidad 80-70%. Rectángulo verde: identidad 70-60%.

2.2. Obtención de mutantes en los genes *psfHH103d_370*, *psfHH103d_373* y *psfHH103d_371.5* de *S. fredii* HH103.

Para poder estudiar la posible implicación de estos genes de HH103 en condiciones de vida libre y en simbiosis con plantas, se construyeron mutantes en cada uno de los genes por inserción de un fragmento interno de cada gen portado en el plásmido pVO155-SPR-npt2-GFP. Para ello se construyeron previamente los plásmidos pMUS1349, pMUS1354 y pMUS1366 que portan un fragmento de aproximadamente 400 pb de la parte central de los genes *d_370*, *d_373* y *d_371.5* respectivamente. Cada fragmento se amplificó por PCR y se clonó en el plásmido pVO155-SPR-npt2-GF usando los puntos de corte *SalI*-*XbaI*. Finalmente, los tres plásmidos resultantes se homogenizaron en la estirpe parental y de esta forma se obtuvieron los mutantes SVQ764 (= HH103 *d_370*), SVQ765 (= HH103 *d_373*) y SVQ766 (= HH103 *d_371.5*). La homogenización de las mutaciones se comprobó por PCR e hibridación (Anexo I).

2.3. Estudio del KPS y del LPS.

Debido a que en *B. diazoefficiens* los hopanoides modifican el lípido A del LPS, decidimos realizar extracciones enriquecidas en el lipopolisacárido (LPS) y en el polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS) de los tres mutantes y analizarlas en geles de poliacrilamida. Ninguno de los mutantes mostró un perfil de LPS o KPS diferente al de la estirpe parental HH103 (**Figura 19**).

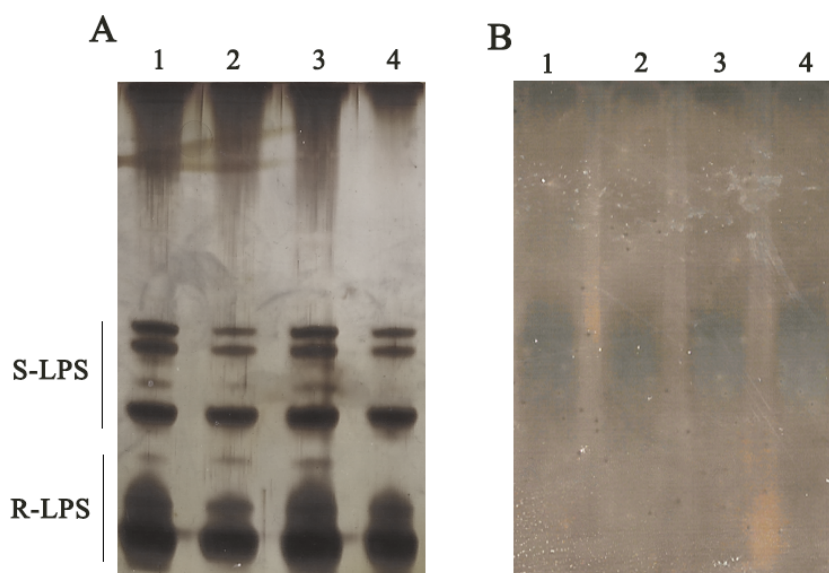


Figura 19. (A) SDS-PAGE y tinción con plata de extractos crudos de LPS y (B) PAGE y tratamiento con azul alciano y tinción con plata de extractos crudos de KPS de *S. fredii* HH103 Rif^R y sus derivados *d_370*, *d_371.5* y *d_373*. Se indica tanto el LPS liso como el rugoso (S-LPS y R-LPS, respectivamente). Carril 1, HH103 Rif^R; carril 2, SVQ764 (*d_370*); carril 3, SVQ765 (*d_373*); carril 4, SVQ766 (*d_371.5*).

2.4. Fenotipo simbiótico de los mutantes d_370, d_373 y d_371.5 de *S. fredii* HH103 en *Glycine max* cv. Williams, *Glycyrrhiza uralensis* y *Lotus burttii*.

Se llevaron a cabo ensayos de nodulación de la estirpe silvestre y los tres mutantes con tres plantas hospedadoras de HH103: soja (*G. max*), *G. uralensis* y *L. burttii*.

G. uralensis es una de las leguminosas hospedadoras de *S. fredii* HH103 que forma nódulos indeterminados. En los ensayos realizados con esta planta se observa que el porcentaje de plantas noduladas respecto de las inoculadas con la estirpe parental y los mutantes SVQ764, SVQ765 y SVQ766 es de un 67 %, 52 %, 67 % y 77%, respectivamente. Además, un bajo porcentaje de plantas inoculadas con la estirpe parental o con cualquiera de los mutantes ensayados tenían un valor de peso seco de la parte aérea tres veces igual o superior al valor obtenido en las plantas control sin inocular (**Tabla 11**).

Los mutantes en los genes d_370, d_373 y d_371.5 no mostraron diferencias drásticas en la capacidad simbiótica con respecto a *S. fredii* HH103 en soja y tampoco en *L. burttii*. Las plantas de *L. burttii* inoculadas con estos mutantes mostraron un peso fresco de la parte aérea similar al de las plantas inoculadas con la estirpe *S. fredii* HH103, con excepción de aquellas plantas inoculadas con el mutante SVQ766 en las que el peso fresco fue mayor que el de aquellas inoculadas con la estirpe parental. No se observaron diferencias significativas en los números de nódulos inducidos por HH103 Rif^R y los tres mutantes ensayados en esta planta (**Tabla 12**). En soja, aunque los mutantes SVQ764, SVQ766 y SVQ765 indujeron la formación de un número de nódulos significativamente menor en comparación con HH103, no hubo diferencias significativas en el peso fresco de los nódulos (**Tabla 13; Figura 20A, B**). No obstante, se produjo un ligero aumento en el peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con los mutantes SVQ765 y SVQ766 respecto a HH103 (**Tabla 13; Figura 20C**).

Tabla 11. Respuesta de *G. uralensis* a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados d_370 (SVQ764), d_373 (SVQ765) y d_371.5 (SVQ766) ^a.

Inoculante	Número de plantas noduladas/ Número de plantas inoculadas	Desarrollo de la plantas ^b
HH103 Rif ^R	16/ 27 (67%)	7/ 27 (26%)
SVQ764 (d_370)	13/ 25 (52%)	8/ 25 (32%)
SVQ765 (d_373)	16/ 27 (67%)	7/ 27 (26%)
SVQ766 (d_371.5)	10/ 13 (77%)	1/ 13 (8%)

^a Los datos representados corresponden a dos test de nodulación diferentes, excepto para el mutante SVQ766 (d_371.5) del que sólo se realizó un test. Los nódulos y el peso seco de la parte aérea se contabilizaron 8 semanas después de la fecha de inoculación.

^b Cada fracción representa el número de plantas del total de la inoculadas cuyo valor de peso seco de la parte aérea fue al menos tres veces mayor o igual que el valor del peso seco de la parte aérea de las plantas control no inoculadas ($7,0 \pm 2,3$ mg/planta). Los números entre paréntesis corresponden al valor en porcentaje del “Número de plantas noduladas/ Número de plantas inoculadas” o al porcentaje de plantas inoculadas cuyo peso seco de la parte aérea fue al menos tres veces igual o mayor que el de las plantas no inoculadas.

Tabla 12. Respuesta de *L. burttii* a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados d_370 (SVQ764), d_373 (SVQ765) y d_371.5 (SVQ766) ^{a, b}.

Inoculante	Número de nódulos	Peso fresco de la parte aérea (mg) ^c
HH103 Rif ^R	7,1±1,1	76,8±13,3
SVQ764 (d_370)	7,4±0,5	78,3±5,2
SVQ765 (d_373)	8,4±0,8	102,9±12,7
SVQ766 (d_371.5)	9,1±0,9	115,2±9,4*

^a Los datos representan la media por planta de al menos 3 jarros, cada uno de los cuales contenía 4 plantas. Las medidas se tomaron 42 días después de la inoculación. Todos los tratamientos se compararon individualmente con los valores de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota una diferencia significativa con un valor de $p < 0,05$.

^b Los datos mostrados se obtuvieron de un único ensayo de nodulación.

^c El peso fresco de la parte aérea de las plantas no inoculadas fue de $17,1 \pm 1,5$ mg por jarro.

Tabla 13. Respuesta de *G. max* cv. Williams a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados d_370 (SVQ764), d_373 (SVQ765) y d_371.5 (SVQ766) ^{a, b}.

Inoculante (gen mutado)	Peso seco parte aérea (g) ^c	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)
HH103 Rif ^R	0,8±0,2	30,8±9,7	339,9±107,5
SVQ764 (d_370)	1,1±0,4	23,2±7,3*	383,1±121,1
SVQ765 (d_373)	1,1±0,4*	18,1±5,7*	395,7±125,1
SVQ766 (d_371.5)	1,2±0,4*	20,0±6,3*	417,8±132,1

^a Los datos representan la media por planta de 4-5 jarros con 2 plantas por cada jarro. Las medidas se tomaron 42 días después de la inoculación. Todos los tratamientos se compararon individualmente con los valores de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota una diferencia significativa con un valor de $p < 0,05$.

^b Los datos muestran un experimento representativo de tres realizados.

^c El peso seco de la parte aérea de las plantas no inoculadas fue de $0,4 \pm 0,1$ g por planta.

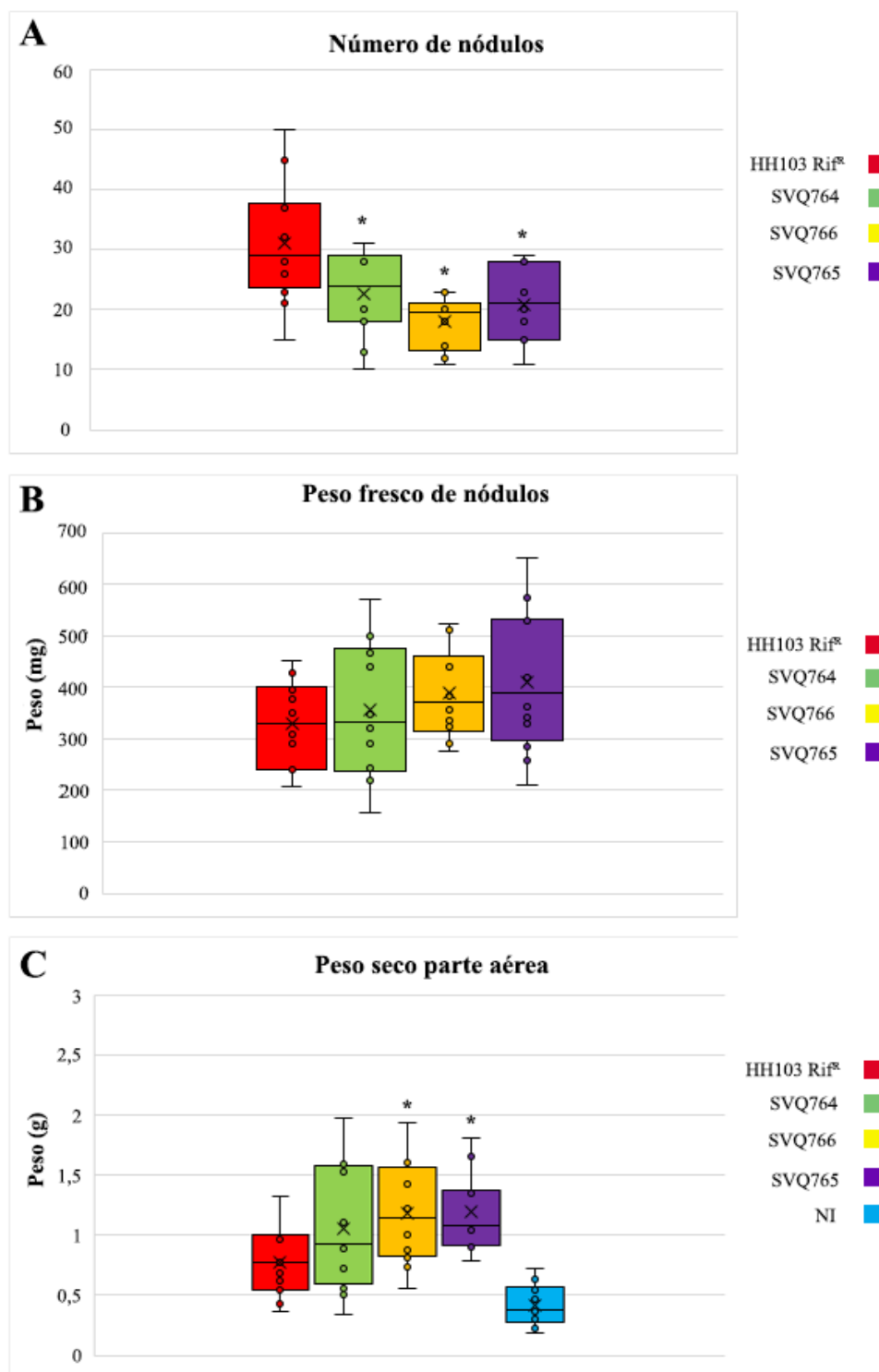


Figura 20. Fenotipo simbiótico de *S. fredii* HH103 y sus derivados SVQ764 (d_370), SVQ765 (d_373) y SVQ766 (d_371.5) en soja Williams. Las barras indican el valor máximo y mínimo de los datos representados. Los círculos son cada uno de los datos representados y la “x” la media de estos datos. La línea del interior de la caja es la mediana, el punto en el que el 50% de los valores representados están por debajo y por encima de este punto. Los datos representan la media por planta de 5-6 jarros con 2 plantas por cada jarro. Los nódulos y la parte aérea se recogieron a los 42 dpi. Cada mutante se comparó con la estirpe parental HH103 usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota diferencias significativas con respecto a la estirpe parental con un nivel de $\alpha=5\%$.

3. Discusión.

Los hopanoides son una clase de lípidos triterpenoides pentacíclicos, presentes en un amplio rango de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, que desempeñan un papel importante en la condensación y estabilización de las bicapas fosfolipídicas. Se cree que la función de los hopanoides es proteger a las células bacterianas del estrés ambiental, como altas temperaturas, altas concentraciones de etanol o altos niveles de oxígeno (Perzl *et al.*, 1998)

En *Bradyrhizobium* sp. se ha descrito que los hopanoides sintetizados confieren resistencia a péptidos antimicrobianos o NCRs (del inglés, *Nodule Cystein Rich*) producidos por leguminosas del clado IRLC (del inglés, *Inverted Repeat Lacking Clade*), que incluye leguminosas con una gran importancia agronómica como *Medicago*, *Pisum*, *Vicia*, *Trifolium*, *Glycyrrhiza*, *Galega* y *Astragalus* (Wojciechowski *et al.*, 2000; Terpolilli *et al.*, 2012; Crespo-Rivas *et al.*, 2016) así como en leguminosas del clado Darlbergoides que incluye plantas del género *Aeschynomene* (Bonaldi *et al.*, 2011). Los genes codificantes de NCRs están ausentes en los genomas de plantas leguminosas que no pertenecen a esos clados, como *L. japonicus*, *G. max*, *G. sojae*, *Phaseolus vulgaris* y *Cajanus cajan*. En *Medicago truncatula*, esta familia de genes está constituida por más de 600 miembros, los cuales se expresan exclusivamente en los nódulos (Montiel *et al.*, 2016). Los NCRs son péptidos antimicrobianos que inducen la endorreduplicación y fuerzan al rizobio a entrar en un estado de no crecimiento (Mergaert *et al.*, 2003). La proteína BacA bacteriana está involucrada en la diferenciación a bacteroide en los nódulos de las leguminosas del clado IRLC. BacA es una proteína transportadora de membrana capaz de portar péptidos (diCenzo *et al.*, 2017). En *S. meliloti*, un mutante en el gen *bacA* no es capaz de diferenciarse dentro de las células simbióticas de *Medicago* lo que provoca la muerte de las bacterias debido a su hipersensibilidad a los péptidos NCRs producidos por las células vegetales (Glazebrook *et al.*, 1993; Haag *et al.*, 2011a). Por tanto, los nódulos infectados con un mutante *bacA* no fijan nitrógeno. En estirpes de *Bradyrhizobium* capaces de establecer simbiosis con *Aeschynomene* (leguminosa que produce NCRs), la proteína BclA, ortóloga de BacA, desempeña un papel similar a ésta (Guefrachi *et al.*, 2015). Por el contrario, en otras especies de rizobios, el gen *bacA* no es necesario para la persistencia y fijación de nitrógeno en los nódulos de plantas hospedadoras que no producen péptidos NCRs (Haag *et al.*, 2011a). En *S. fredii* HH103, un mutante *bacA* no muestra ningún defecto simbiótico con las leguminosas *G. max*, *C.*

cajan (no pertenecientes al clado IRLC) y *G. uralensis* (perteneciente al clado IRLC y productora de NCRs) (Montiel *et al.*, 2017). Además, tanto HH103 como su mutante *bacA*, a diferencia de *S. meliloti*, son poco sensibles a los péptidos NCR247 y NCR335 de *Medicago* (Crespo-Rivas *et al.*, 2016).

El hecho de que en HH103 los genes *d_370*, *d_371.5* y *d_373* estén bajo el control de una NB, que HH103 sea poco sensible a los péptidos NCRs probados y no sufra diferenciación terminal en la leguminosa del clado IRLC *Glycyrrhiza* (Crespo-Rivas *et al.*, 2016), sugería que estos genes podrían tener un posible papel relevante en simbiosis, al menos con *G. uralensis*. En colaboración con el Dr. Peter Mergaert (CNRS, Gif-sur-Yvette, líder de uno de los principales grupos que estudian el efecto de los péptidos NCRs), se introdujeron estos genes en *S. meliloti* (que carece de ellos) para estudiar el efecto producido en su simbiosis con *M. truncatula*, así como su sensibilidad a péptidos NCRs. No se observó ningún cambio en el fenotipo simbiótico de las plantas de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* portando los genes de los hopanoideos con respecto a las inoculadas con la estirpe parental que carecía de ellos (P. Mergaert, comunicación personal).

Por otro lado, en *Bradyrhizobium*, los hopanoideos modifican el lípido A del LPS cambiando su estructura y formando lo que se conoce como HoLa (hopanoide-lípido A), donde el hopanoide está unido covalentemente a un poliol hopanoide extendido. Los ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA, del inglés *very long chain fatty acids*) del HoLa abarcan toda la bicapa, uniendo las dos capas e induciendo la compactación de las colas lipídicas de la bicapa, aumentando la resistencia mecánica de la membrana (Silipo *et al.*, 2014). En los experimentos SDS-PAGE realizados en nuestro laboratorio, *S. fredii* HH103 tiene un patrón de bandas muy característico distribuido en dos regiones principales. Una o dos bandas de migración rápida fuertemente teñidas que se corresponden con el LPS rugoso (R-LPS), compuesto por el lípido A y el *core*, y otra región compuesta por varias bandas de migración lenta que se corresponden con el LPS liso (S-LPS), compuesto por el antígeno O con diferentes niveles de polimerización (Crespo-Rivas *et al.*, 2016). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, mostraron que el perfil electroforético del LPS de los bacteroides de *S. fredii* HH103 aislados de los nódulos *G. max* o *C. cajan* era indistinguible del mismo obtenido de cultivos de vida libre. Por el contrario, el perfil de LPS de bacteroides aislados de nódulos de *G. uralensis* está claramente alterado en comparación al de HH103 en vida libre (Crespo-Rivas *et al.*, 2016). Cuando hemos realizado SDS-PAGE de los mutantes de *S. fredii* HH103 en los

genes de los hopanoides, el patrón electroforético del LPS purificado de cultivos de vida libre, así como de los bacteroides en soja (datos no mostrados), era igual al previamente visto de la estirpe parental, por lo que parece que estos genes no modifican el lípido A en HH103. Será necesario analizar el LPS de bacteroides en *Glycyrrhiza* de los mutantes en estos genes para dilucidar si los cambios detectados pudieran estar relacionados con la síntesis de hopanoides. En cualquier caso, los mutantes en los genes *hpn* de HH103 no están afectados negativamente en su interacción con esta planta.

En *S. fredii* NGR234 la expresión de los genes de síntesis de hopanoides es dependiente del flavonoide daidceína y NodD1 a través de la NB1, lo que en un principio parecía indicar que estos compuestos podrían desempeñar alguna función simbiótica en esta bacteria (Kobayashi *et al.*, 2004). Tras el tratamiento de esta bacteria con daidceína u otros flavonoides aplicados individualmente o combinados, no hay detección de hopanoides (E.L. Kannenberg, comunicación personal). A pesar de esta información, el hecho de que ambas estirpes de *S. fredii* sean tan diferentes (por ejemplo, la presencia de flavonoides afecta al LPS y KPS de NGR234 pero no de HH103, y tienen efecto en el EPS de HH103 pero no en el EPS de NGR234), nos llevó a estudiar si HH103 producía hopanoides. En colaboración con el laboratorio del Dr. Eric Giraud (Universidad de Montpellier; responsable del estudio de los hopanoides en *Bradyrhizobium* sp.) se analizó la posible producción de hopanoides por HH103 y la posible estructura de estos, ya que existen diferencias entre los operones implicados en su biosíntesis entre *Bradyrhizobium* sp. y *S. fredii* HH103. Puesto que estos genes son inducibles por flavonoides, los experimentos para la determinación de los hopanoides se llevaron a cabo tanto en presencia como en ausencia de genisteína. Los experimentos de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas realizados (**Figura 21**), muestran la presencia en la muestra inducida con genisteína de muy bajas cantidades de un hopanoide denominado diplopteno, que muy probablemente se deba a contaminación de las muestras. El Dr. Eric Giraud concluyó que HH103 no produce hopanoides en vida libre, ni en presencia ni en ausencia de genisteína, al menos en las condiciones testadas. No podemos descartar que, en otras condiciones, HH103 pudiera producir cantidades significativas de estos compuestos.

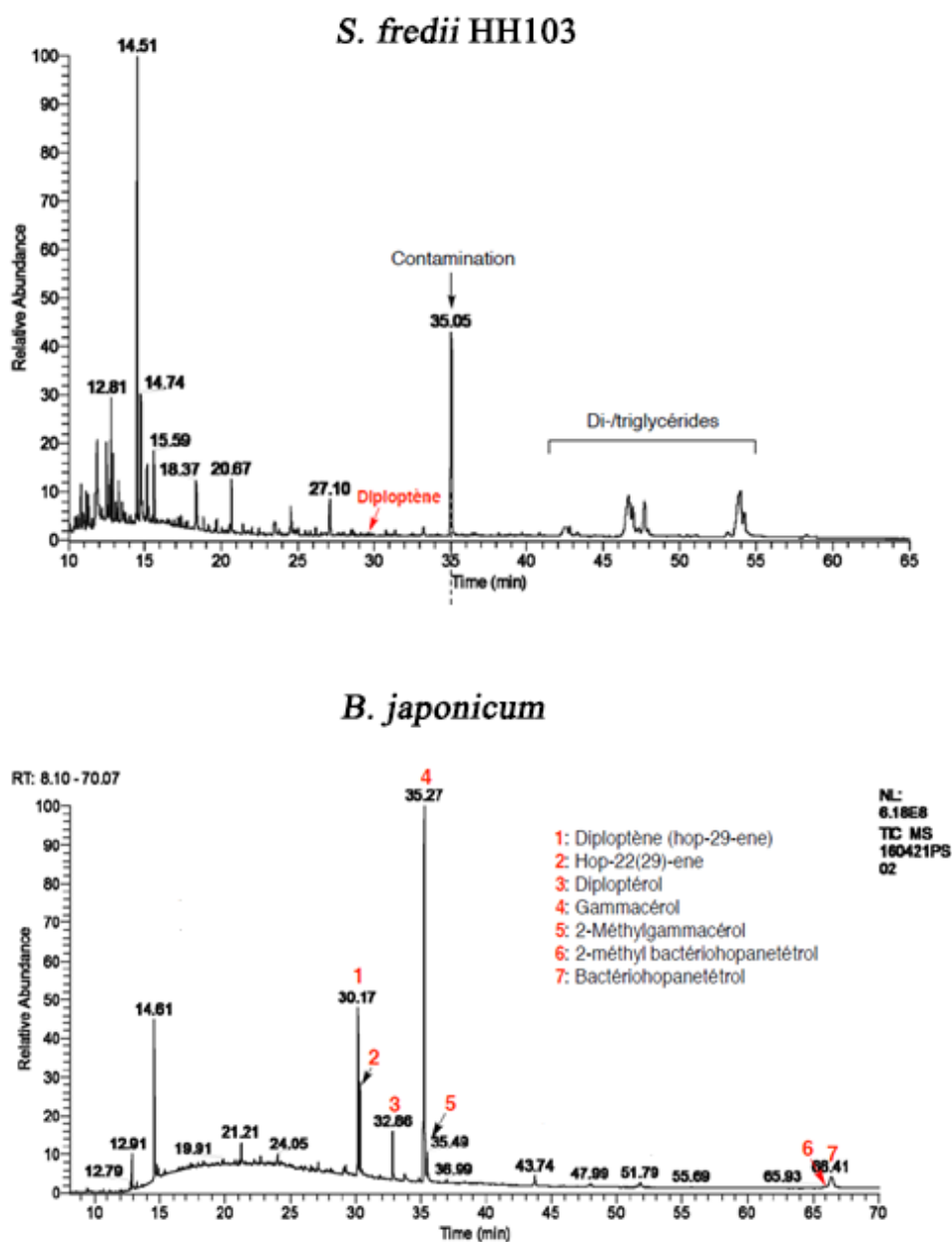


Figura 21. Experimento de cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas de lípidos extraídos de *S. fredii* HH103 y *B. japonicum* crecidos en presencia de genisteína.

Por otro lado, aunque los estudios de RNAseq mostraban una inducción con genisteína del grupo de 5 genes psfHH103d_373 a psfHH103d_370 (*shc*) (Tabla 14), la visualización del mapeo de las lecturas correspondientes a estos genes evidenció que la mayoría de las lecturas obtenidas tras la inducción con genisteína apareaban mayoritariamente con la región del genoma que corresponde al gen d_373. Teniendo en

cuenta estos resultados, d_373 parece ser el único gen de este grupo que se expresa diferencialmente en presencia de genisteína. Las lecturas presuntamente atribuidas a los otros genes vendrían determinadas, posiblemente, por las lecturas que corresponden al extremo 3'-UTR del gen d_373, “falseando” los datos de expresión diferencial que muestran los estudios en bruto (**Figura 22**). Por tanto, en las condiciones analizadas, los genes psfHH103d_372 a 370 no tienen una alta expresión. Este hecho, junto con que d_373 es un gen exclusivo de HH103 y con los resultados obtenidos en los ensayos simbióticos, sugiere que esta estirpe no produce hopanoides de importancia simbiótica, al menos en simbiosis con *G. max.*, *L. burttii* o *G. uralensis*. Entonces ¿por qué este gen se induce notablemente en presencia de genisteína? ¿Cuál es su función en *S. fredii* HH103? La superfamilia NTF2 de proteínas supone un clásico ejemplo de evolución divergente en el que las proteínas que la constituyen presentan ciertos detalles estructurales que son comunes pero que divergen mucho en la función que desempeñan. Por tanto, se requieren muchos más estudios para determinar el papel biológico de d_373.

Tabla 14. Lecturas de los genes d_373 a d_370 de HH103 en presencia y ausencia de genisteína obtenidas por RNAseq.

Nombre del gen	<i>Fold change</i> (relativizado)	Media HH103	Media HH103+genisteína
<i>shc</i> (d_370)	4,13	190,62	950,03
d_371	2,99	114,22	510,72
<i>hpnD</i> (d_371.5)	4,97	87,21	711,50
d_372	18,33	42,18	2613,97
d_373	19,30	100,01	8584,36

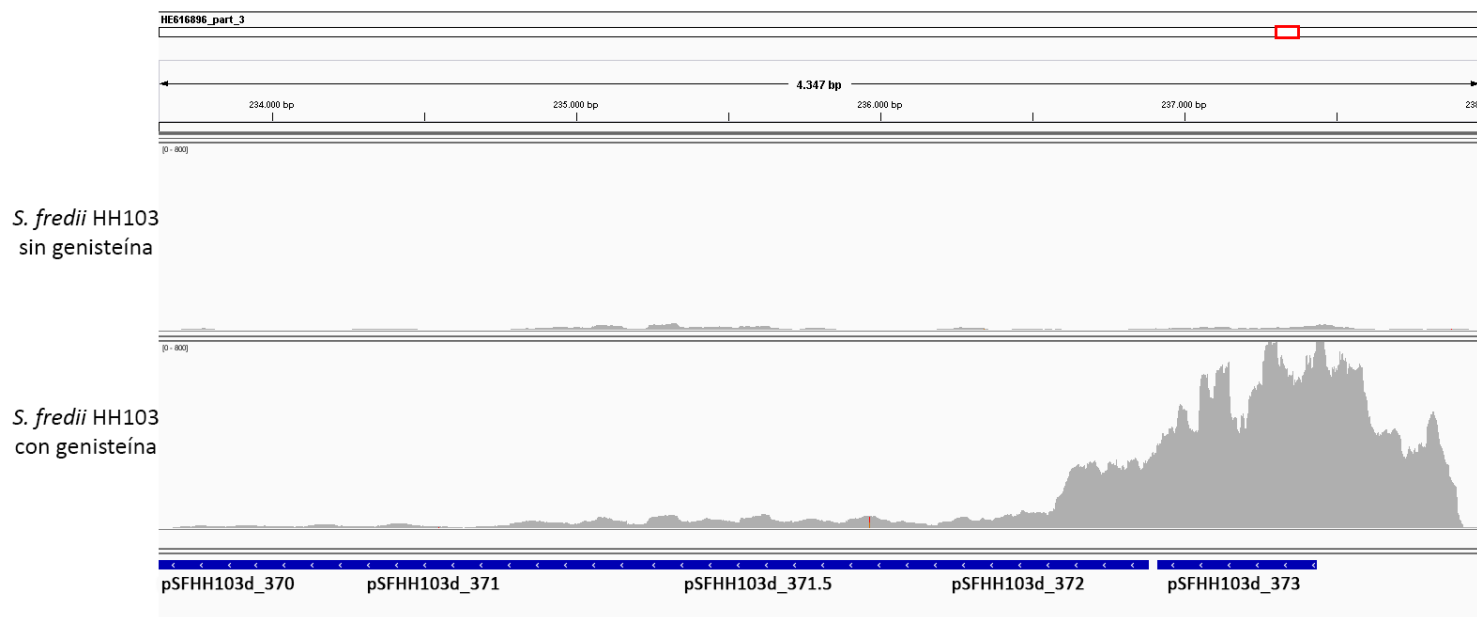


Figura 22. Nube de transcritos de la región génica psFHH103d_373 a 370 de *S. fredii* HH103 en presencia y ausencia de genisteína.

Capítulo III. Caracterización del grupo de genes

SFHH103_00346 (*flgJ*)-00347-00348.

1. Introducción.

En esta Tesis hemos caracterizado una región génica situada en el cromosoma de *S. fredii* HH103 y que está constituida por tres genes (SFHH103_00346 a SFHH103_00348). La transcripción de estos genes se induce por flavonoides y NodD1. Esta región está precedida por posibles cajas SyrM (SB) y *tts* (TB), ambas imperfectas. El primer gen, SFHH103_00346, codifica la proteína flagelar FlgJ, mientras que los genes SFHH103_00347 y SFHH103_00348 (de aquí en adelante 00347 y 00348) codifican proteínas hipotéticas (**Figura 23**).

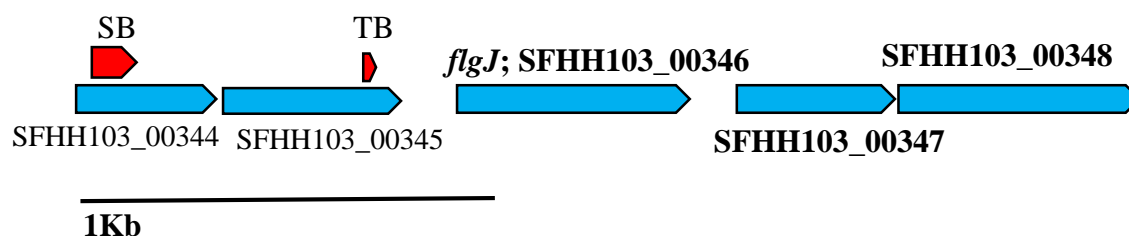


Figura 23. Representación de la región génica cromosómica de los genes *flgJ*, 00347 y 00348. En rojo están representadas las cajas SyrM (SB) y *tts* (TB).

2. Resultados.

2.1. Análisis *in silico* de la región SFHH103_00346-SFHH103_00348.

El gen *flgJ* consta de 546 nucleótidos y codifica una proteína de 181 aminoácidos (~19 kDa). La proteína FlgJ de HH103 presenta una identidad del 100 % con proteínas presentes en otras estirpes de *S. fredii* como *S. fredii* CCBAU 45436 y *S. fredii* USDA 205, entre otras, y un 98 % de identidad con FlgJ de *S. fredii* NGR234. Recientemente se ha determinado que la proteína FlgJ producida por β - y γ -proteobacterias, tales como *Salmonella enterica*, *Vibrio* spp., *Sphingomonas* sp. y *Pseudomonas* spp., es bifuncional, con un dominio N-terminal necesario para el ensamblaje adecuado del flagelo, y un dominio C-terminal con actividad β -N-acetilglucosaminidasa que actúa como una autolisina para la degradación localizada del peptidoglicano de la pared celular y formación del poro donde se inserta el flagelo (Herlihey *et al.*, 2014). En algunas α -proteobacterias, incluyendo *Rhodobacter sphaeroides*, FlgJ tiene la misma función que el dominio N-terminal de la proteína FlgJ de *S. enterica*, actuando como proteína de andamiaje, pero carece de dominio C-terminal con actividad lítica. La ausencia de

actividad lítica por parte de FlgJ es compensada por SltF, una enzima lítica codificada dentro del operón *flg* y que es responsable de la penetración de la varilla flagelar en esta bacteria. Esta misma situación se produce en los rizobios donde se ha analizado, como *S. medicae*, *S. meliloti*, *S. fredii* NGR234 (González-Pedrajo *et al.*, 2002; De la Mora *et al.*, 2007), y *S. fredii* HH103. En esta estirpe, el gen SFHH103_00334 codifica una proteína de 188 aminoácidos (*accessión number* CCE94834.1) que contiene un dominio SLT presente en las proteínas transglicosilasas líticas y que podría desempeñar la misma función que la proteína SltF de *R. sphaeroides*.

El gen 00347 codifica una proteína de 122 aminoácidos (~13,7 kDa), que es 100 %, 99 %, 88% y 65 % idéntica a las proteínas N181_01515, NGR_c03050, SMc03072 y CN09_15695 de *S. fredii* USDA 205, *S. fredii* NGR234, *S. meliloti* 1021 y *Agrobacterium rhizogenes*, respectivamente. El producto codificado por 00347 tiene una identidad estructural del 79% (82% de cobertura) con la chaperona FlgN de *Bordetella pertussis*. En *S. enterica* serovar *Typhimurium*, la chaperona FlgN del sistema de secreción tipo 3 tiene como sustrato las proteínas de unión entre el gancho y el filamento, FlgK y FlgL (Bennett *et al.*, 2001). Este tipo de chaperonas son pequeñas proteínas que se unen a su(s) sustrato(s) en el citoplasma, protegiéndolo de la degradación y/o previniendo la agregación y permitiendo el transporte eficiente del sustrato a la maquinaria de exportación (Aldridge y Hughes, 2002).

El gen 00348 tiene una longitud de 567 nucleótidos, codifica una proteína hipotética de 188 aminoácidos (~20,3 kDa) y está presente en muchas especies del género *Sinorhizobium* con altos porcentajes de identidad (73-100%). En cuanto a su estructura, con un 50 % de cobertura, es 95 % idéntica a la proteína flagelar FliL de *Vibrio alginolyticus*, una proteína transmembrana con una gran región periplásmica que se asocia con el cuerpo basal flagelar y que es importante para la función del motor en condiciones que dificultan el movimiento, como los ambientes muy viscosos (Takekawa *et al.*, 2019).

En experimentos previos de nuestro grupo en colaboración con la Dra. Soto (EEZ, CSIC, Granada) hemos observado que la movilidad en superficie de *S. fredii* HH103 se incrementa notablemente en presencia de genisteína. Nuestros análisis por *RNAseq* revelan que la transcripción de los genes *flgJ*, 00347 y 00348 se induce por flavonoides, NodD1 y TtsI, y se reprime por NodD2 y NolR. El tener un gen flagelar cuya expresión es modulada por flavonoides y diversos reguladores simbióticos y el que en experimentos previos hayamos comprobado que la movilidad de HH103 en superficie se incrementa en

presencia de genisteína, nos llevó a indagar si estos genes podían estar relacionados con este fenómeno y desempeñar algún papel relevante en simbiosis con algunas plantas hospedadoras.

2.2. Obtención de mutantes en los genes *flgJ*, 00347 y 00348.

En esta Tesis se han construido mutantes por delección en fase de los genes 00347 y 00348, además de dos mutantes independientes en *flgJ* (uno por delección en fase y otro por inserción del casete *lacZ* Δ p-Gm^R).

La construcción de los mutantes por delección se realizó mediante PCR solapante. Para ello se diseñaron cuatro cebadores para cada gen: cebador A, secuencia homóloga a un fragmento de ADN situado aguas arriba del gen a deleccionar y que porta la diana de restricción para la enzima *Hind*III (*flgJ* y 00348) ó *Xba*I (00347); cebador B, secuencia complementaria a la del cebador C; cebador C, secuencia homóloga a un fragmento de 14 nucleótidos localizado en el comienzo del gen seguido de otro de la misma longitud localizado al final del mismo gen; cebador D, secuencia complementaria a un fragmento de ADN situado aguas abajo del gen a deleccionar y que porta la diana de restricción para la enzima *Bam*HI (*flgJ*) ó *Sph*I (00347) ó *Eco*RI (00348). Se realiza una primera PCR usando como ADN molde el ADN genómico de SVQ269 (HH103Rif^R) y los cebadores A-B para amplificar fragmentos de 630, 544 y 559 pb (*flgJ*, 00347 y 00348 respectivamente), y posteriormente se hace una segunda PCR usando el ADN genómico de SVQ269 y los cebadores C-D y se amplificaron fragmentos de 636, 563 y 588 pb (*flgJ*, 00347 y 00348 respectivamente). Finalmente, se realizó una tercera PCR en la que se utilizan los cebadores A-D y los dos fragmentos obtenidos en las PCRs anteriores como ADN molde. De esta forma se amplificaron fragmentos de 1,2, 1 y 1,1 kb que portaban las secuencias aguas arriba y abajo del gen *flgJ*, 00347 y 00348 respectivamente. Estos fragmentos se digirieron con sus respectivas enzimas de restricción (*Hind*III/*Bam*HI para *flgJ*, *Xba*I/*Sph*I para 00347, *Hind*III/*Eco*RI para 00348) y se clonaron en el vector suicida para rizobios pK18*mobsacB* previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Se obtuvieron así los plásmidos pMUS1348, pMUS1355 y pMUS1347 que contenían las versiones delecionadas de *flgJ*, 00347 y 00348 respectivamente. Por último, estos plásmidos se conjugaron utilizando como estirpe receptora para la homogenización la estirpe HH103 Rif^R y, finalmente se obtuvieron los mutantes SVQ807 (= HH103 Rif^R Δ *flgJ*), SVQ768 (= HH103 Rif^R Δ 347) y SVQ775 (= HH103 Rif^R Δ 348). De aquí en adelante, estos mutantes se denominarán: Δ *flgJ*, Δ 347 y Δ 348. Mediante la inserción del

casete *lacZ* Δ p-Gm^R se construyó un segundo mutante en el gen *flgJ*. Para ello previamente se construyó el plásmido pMUS1408 que porta un fragmento de 1581 pb que contiene el gen *flgJ* amplificado por PCR usando los cebadores flgJ-A/D y clonado en el plásmido pK18*mob*. Este plásmido se digirió con *PstI* cuya única diana se encuentra en el interior de la secuencia del gen *flgJ*. El plásmido linealizado se ligó con un fragmento de ~4,4 Kb que contiene el casete *lacZ* Δ p-Gm^R digerido con *PstI* y obtenido a partir del plásmido pAB2001 consiguiendo el plásmido pMUS1410. Este plásmido se homogenizó en la estirpe SVQ269 y se obtuvo el mutante SVQ801 (= HH103 Rif^R *flgJ::lacZ*), de aquí en adelante HH103 *flgJ::lacZ*. Para confirmar las mutaciones se realizaron hibridaciones siguiendo el método descrito en el punto 1.8.13 de materiales y métodos de esta Tesis y PCR (Anexo I).

Para la complementación de la mutación de los genes 00347 y 00348, la región *flgJ*-00347-00348 se amplificó por PCR usando los cebadores operonflgJFKpnI-F/operonflgJ348-R (fragmento de 3126 pb), se digirió con las enzimas de restricción *KpnI/XbaI* y se clonó en pK18*mob*, vector Km^R y suicida en rizobios. El plásmido generado, pMUS1411, fue transferido por conjugación a las estirpes receptoras Δ 347 y Δ 348 y se seleccionaron transconjugantes Km^R, comprobados por PCR, que deberían corresponder a clones donde pMUS1411 se hubiera introducido en el genoma del receptor mediante un evento de recombinación homóloga. De aquí en adelante, los mutantes complementados se nombrarán como Δ 347C y Δ 348C.

2.3. Análisis de la funcionalidad de las cajas SyrM (SB) y *tts* (TB) en presencia de genisteína.

El análisis de la secuencia aguas arriba del gen *flgJ* reveló que esta región está precedida por una caja *tts* (TB) y una caja SyrM (SB), ambas imperfectas y localizadas en las posiciones del -152 a -125 y del -817 a -752 desde el inicio de la traducción de *flgJ*, respectivamente. La secuencia nucleotídica de la TB que precede a *flgJ* es similar a la de las secuencias consenso de las TB de HH103 (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b), al menos en su primera parte (**Figura 24**). En el caso de la SB, solo se han encontrado uno (GCAT N17 GCAT) de los cinco posibles motivos descritos por Barnett y Long (2015) y usados por Acosta-Jurado *et al.* (2020) en el análisis de los genes regulados por *syrM* en *S. fredii* HH103.

Secuencia consenso de las TB de HH103	GTCAG	N5	CG	N2	AG	N10	TA
Secuencia de la TB que precede a <i>flgJ</i>	A TTCAG	N5	CG	N2	GA	N10	GC

Figura 24. Comparación de la secuencia consenso nucleotídica de las TB de *S. fredii* HH103 con la TB imperfecta localizada aguas arriba de SFHH103_00346 (*flgJ*). En rojo se muestran aquellos nucleótidos que son diferentes.

Dado que nuestros análisis por RNAseq de esta región cromosómica revelan que su transcripción se induce por flavonoides, NodD1 y TtsI (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b), se investigó si la capacidad de inducción de la genisteína sobre este grupo génico está mediada por la posible caja TB, y si el motivo de SB encontrado tiene alguna influencia en dicha inducción. Para ello se llevaron a cabo experimentos de actividad β -galactosidasa usando fusiones transcripcionales de fragmentos de ADN que contenían bien la TB, bien la SB y la TB, con un gen *lacZ* carente de promotor.

Para ello, se amplificaron por PCR dos fragmentos de distinta longitud de la posible región promotora de estos genes: el primero se amplificó con los cebadores promotorflgJ-F1/promotor-R, generando un fragmento de 884 pb que incluye ambas cajas; el segundo fragmento, de 191 pb, se amplificó usando los cebadores promotorflgJ-F2bisEco/promotor-RbissphI e incluye sólo la TB. Ambos fragmentos se clonaron en el plásmido pMP220 que porta el gen *lacZ* sin promotor. Se obtuvieron los plásmidos pMUS1392 (SB y TB) y pMUS1393 (TB). Estos plásmidos se introdujeron por conjugación en la estirpe silvestre (HH103 Rif^R) y en diferentes fondos mutantes donde distintos genes reguladores simbióticos estaban inactivados con el interposón Ω o deletados: *nodD1* (SVQ318), *nodD2* (SVQ515), *nolR* (SVQ557), *ttsI* (SVQ519) y Δ *syrM* (SVQ724).

A continuación, se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa, en ausencia y presencia de genisteína, de HH103 Rif^R y los diversos mutantes en genes reguladores portando los plásmidos pMUS1392 o pMUS1393. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 25**. En el ensayo de las distintas estirpes portando el plásmido pMUS1393 (TB), la presencia de genisteína induce claramente la actividad β -galactosidasa en HH103 Rif^R (**Figura 25A**). En los diversos mutantes analizados, se observa una reducción total en los niveles de actividad β -galactosidasa en presencia de genisteína en los fondos *nodD1* y *ttsI*, y una reducción parcial pero significativa en el fondo *nodD2* con respecto al fondo silvestre en la misma condición. Por tanto, los reguladores NodD1 y TtsI son necesarios para la activación de esta TB, lo que confirma su funcionalidad. Además, NodD2 parece influenciar positivamente la actividad de dicha TB. En el caso de la región

promotora que incluye las cajas SB y TB (plásmido pMUS1392, **Figura 25B**), los resultados vuelven a mostrar la esencialidad de las proteínas NodD1 y TtsI para la inducción transcripcional por genisteína, y muestran influencias leves de SyrM y NolR, de modo positivo y negativo respectivamente, sobre esta inducción. En condición control (sin flavonoide), la actividad no varía en ninguno de los fondos mutantes con respecto a la estirpe silvestre exceptuando el fondo mutante *syrM* en el que se observa una mayor expresión que en HH103.

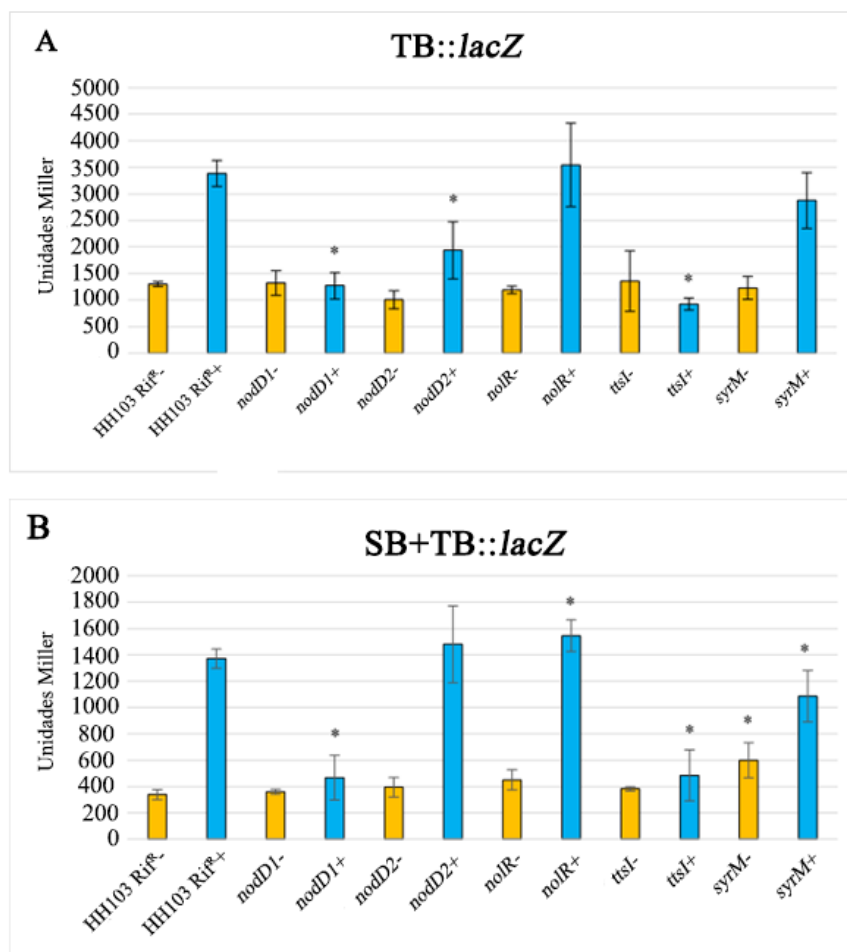


Figura 25. Ensayos de actividad β -galactosidasa de los plásmidos (A) pMUS1393 (TB) y (B) pMUS1392 (SB+TB) en el fondo silvestre *S. fredii* HH103 y en diferentes fondos mutantes en los genes *nodD1*, *nodD2*, *nolR*, *ttsI* y *syrM* en ausencia (-, barras amarillas) y presencia de genisteína (+, barras azules). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en la estirpe parental en las mismas condiciones. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores con * son significativamente diferentes de los obtenidos en la estirpe silvestre al nivel $\alpha = 5\%$. Los datos representados corresponden a la media de seis (A) y cuatro (B) experimentos.

2.4. ¿Forman *flgJ*, 00347 y 00348 un operón?

El análisis de las nubes de transcritos de la región génica cromosómica constituida por los genes *flgJ*, 00347 y 00348 muestra que estos tres genes presentan una clara inducción por genisteína, lo que sugiere que se transcriben de modo conjunto (**Figura 26**).

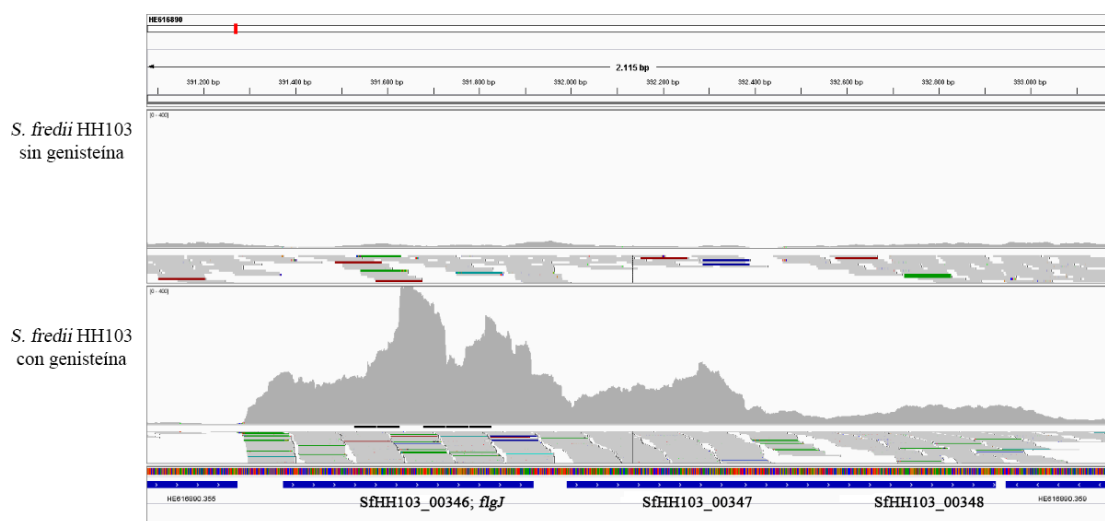


Figura 26. Nube de transcritos de la región génica SFHH103_00346-00348 de *S. fredii* HH103 en presencia y ausencia de genisteína.

Para verificar esta hipótesis, se realizaron experimentos de RT-PCR (punto 1.8.10 de materiales y métodos) utilizando cebadores internos de los genes a estudiar que abarcaban parte del extremo 3' del primer gen, la región intergénica, y parte de la región 5' del siguiente gen, de modo que, si hay un transcrito que incluya a *flgJ* y 00347 o a 00347 y 00348, aparecería una banda en el carril que correspondiese al ADNc ya que habría un ARNm común para estos genes.

Para ello, se realizaron los experimentos de RT-PCR en condiciones de presencia y ausencia de genisteína. Además, se empleó ADN genómico (ADNg) como control positivo, así como ARN como control negativo debido a que no se debe obtener amplificación con ninguna de las parejas de cebadores al no estar presente ningún tipo de ADN (ADNc o ADNg), salvo que exista contaminación.

Para amplificar estos fragmentos se emplearon los cebadores de la **Tabla 4**. Como control negativo se utilizaron los cebadores 348-349_F/348-349_R que no deben amplificar el fragmento entre los genes 00348 y 00349 ya que estos tienen orientación inversa. Además, se emplearon cebadores internos para el gen *flgJ* y para el gen *16S* como controles positivos (**Figura 27**).

Tanto en presencia como ausencia de genisteína, se amplificó una banda de alrededor de 300 pb que corresponde con la región intergénica de los genes 00347-00348 usando como molde ADNc, lo que indica que existe una transcripción conjunta de estos genes. En el caso de la pareja *flgJ*-00347, no se obtuvo amplificación usando ADNc como molde y sí cuando se empleó ADNg, lo que sugiere que *flgJ* y 00347 se transcriben de forma

independiente. Tanto en los controles positivos como negativos se obtuvieron los resultados esperados: con los cebadores internos del gen *flgJ* y con los del gen *16S* se amplificaron fragmentos de alrededor de 120 y 200 pb respectivamente usándose tanto ADNg como ADNc como molde, mientras que el fragmento entre los genes 00348 y 00349 sólo se amplificó cuando se empleó ADNg como molde (**Figura 27**).

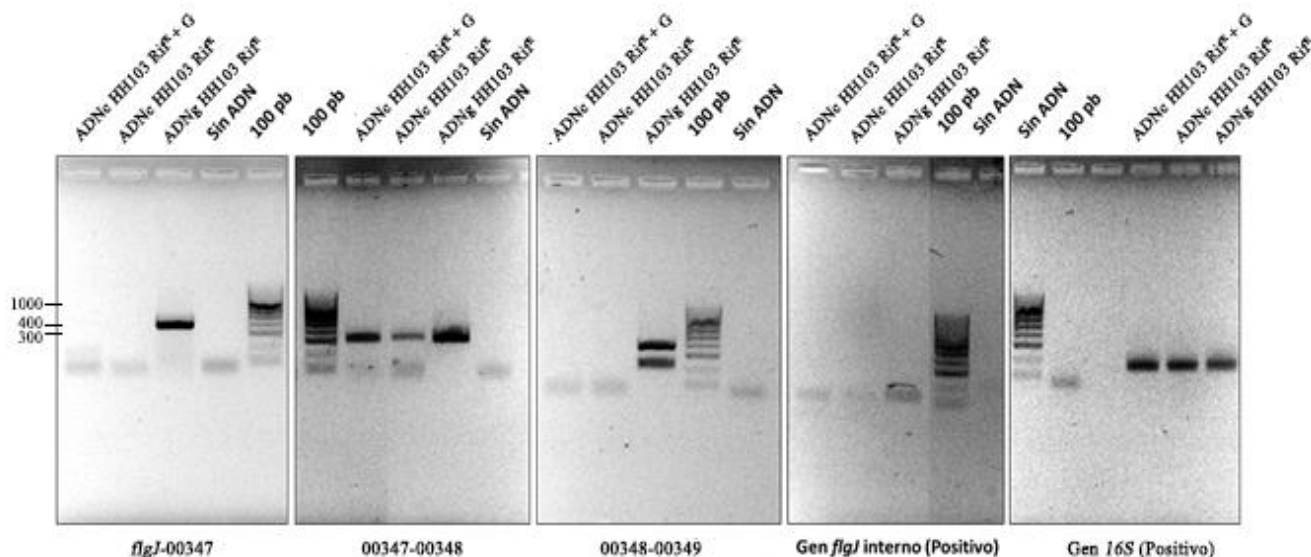


Figura 27. Análisis de cotranscripción por RT-PCR del grupo génico *flgJ*-00347-00348. El ADNc obtenido en ausencia (ADNc HH103 Rif^R) o presencia (ADNc HH103 Rif^R + G) de genisteína se utilizó como molde para la RT-PCR. El marcador utilizado es de 100 pb (NEB). Como control positivo se usó el ADN genómico de HH103 Rif (ADNg HH103 Rif^R) y como control negativo el ARN extraído (sin ADN). Los tamaños (pb) de las bandas del marcador se muestran a la izquierda de la figura.

Para verificar la no cotranscripción de los genes *flgJ* y 00347 se empleó una pareja adicional de cebadores (346-347_F2/346-347_R2) y se repitió el experimento de RT-PCR partiendo de una nueva extracción de ARN. Los resultados obtenidos fueron los mismos que en el caso anterior, lo que sugiere que o bien *flgJ* y 00347-00348 se transcriben por separado o bien la posibilidad de que los tres genes se transcriban juntos pero que el transcrito primario se procese rápidamente de modo que no se detecte en experimentos de RT-PCR.

2.5. Efecto de la mutación en los genes *flgJ*, 00347 y 00348 sobre la producción de EPS.

En *S. fredii* HH103 la presencia de genisteína afecta negativamente a la producción del exopolisacárido (EPS), dando lugar a un fenotipo rugoso o no mucoso (Vinardell *et al.*, 2004b). Durante los estudios con los mutantes en los genes *flgJ*, 00347 y 00348 se observaron ciertas diferencias en la mucosidad de alguno de ellos respecto a la estirpe

silvestre. Para estudiar si la mutación de alguno de estos genes tenía algún efecto sobre la producción del EPS de *S. fredii* HH103, se dispusieron gotas de las estirpes HH103 Rif^R, *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$ en placas de medio YMA con y sin genisteína y se incubaron a 28°C durante 96 horas. Además, puesto que las primeras observaciones mostraron que la estirpe $\Delta 347$ es aparentemente más mucosa que la estirpe parental y que el resto de mutantes cuando se cultiva en medio TY líquido, decidimos hacer el mismo ensayo en placas de TY con y sin genisteína.

En YMA, en ausencia de genisteína, *S. fredii* HH103 y los mutantes ensayados tienen un fenotipo mucoso. Cuando este medio se suplementa con genisteína, tanto la estirpe parental como los mutantes muestran un aspecto rugoso (**Figura 28A**). En medio TY sólido los resultados en ambas condiciones, control y genisteína, son los mismos que los observados en YMA en la misma condición, si bien, aunque no se aprecie claramente en la imagen, $\Delta 347$ es más mucoso que el resto de estirpes, incluyendo HH103 Rif^R, en la condición control (**Figura 28B**).

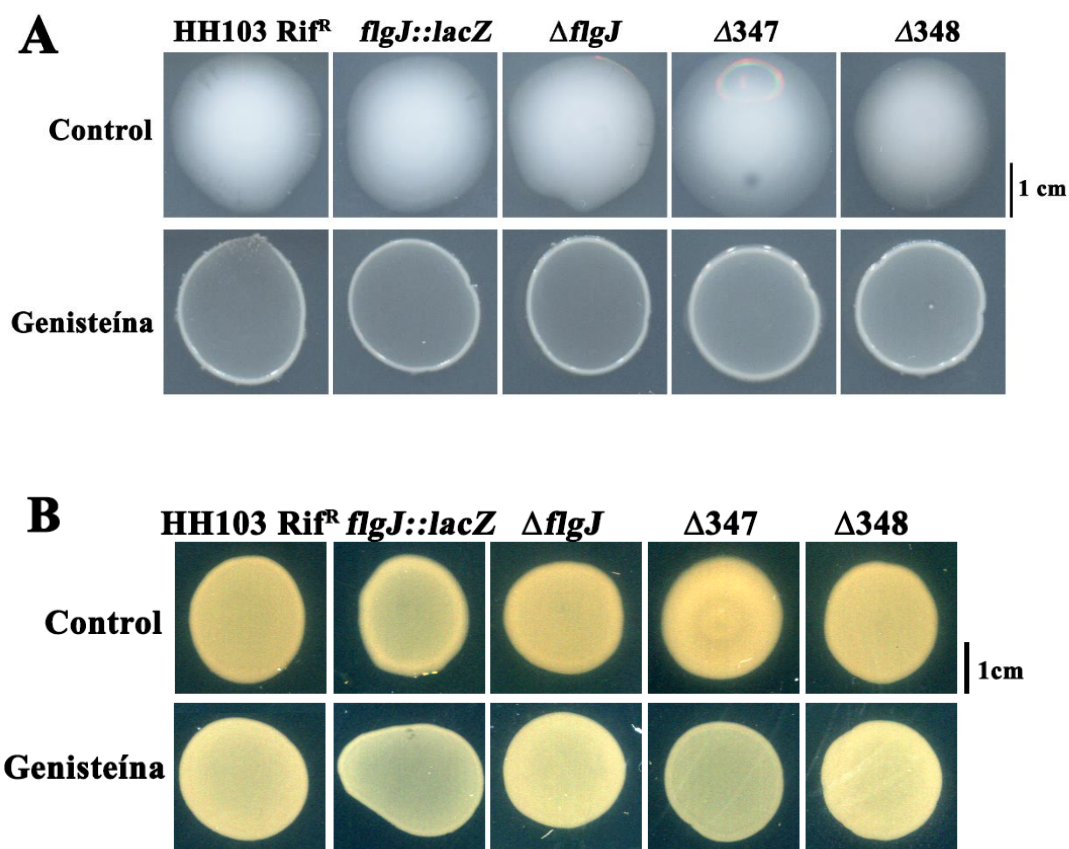


Figura 28. Mucosidad de *S. fredii* HH103 y diferentes mutantes en (A) YMA y (B) TY en ausencia o presencia de genisteína. En la zona superior de cada columna se indica el gen afectado por la mutación en cada estirpe. El control indica la ausencia de genisteína.

Adicionalmente, se estudió la producción de EPS en ausencia o presencia de genisteína en *S. fredii* HH103 y en los mutantes en *flgJ*, 00347 y 00348 siguiendo el método de antrona que consiste en la cuantificación de la cantidad de equivalentes de glucosa presentes en el medio extracelular de cultivos de estas estirpes en YM. Esta cuantificación se puede relacionar directamente con la producción de EPS. Los resultados obtenidos, que se muestran en la **Figura 29**, indican que el mutante $\Delta 347$ produjo una cantidad significativamente mayor de EPS que la estirpe silvestre en la condición control. La presencia de genisteína reduce la cantidad de equivalentes de glucosa producidos por HH103 Rif^R y todos los mutantes, especialmente en la estirpe $\Delta 348$, donde la producción de EPS es significativamente menor que la de la estirpe parental en la misma condición. Estos resultados sugieren que los genes 00347 y 00348 están de algún modo relacionados con la producción de EPS, aunque serán necesarios más experimentos para determinar cuál es esa relación.

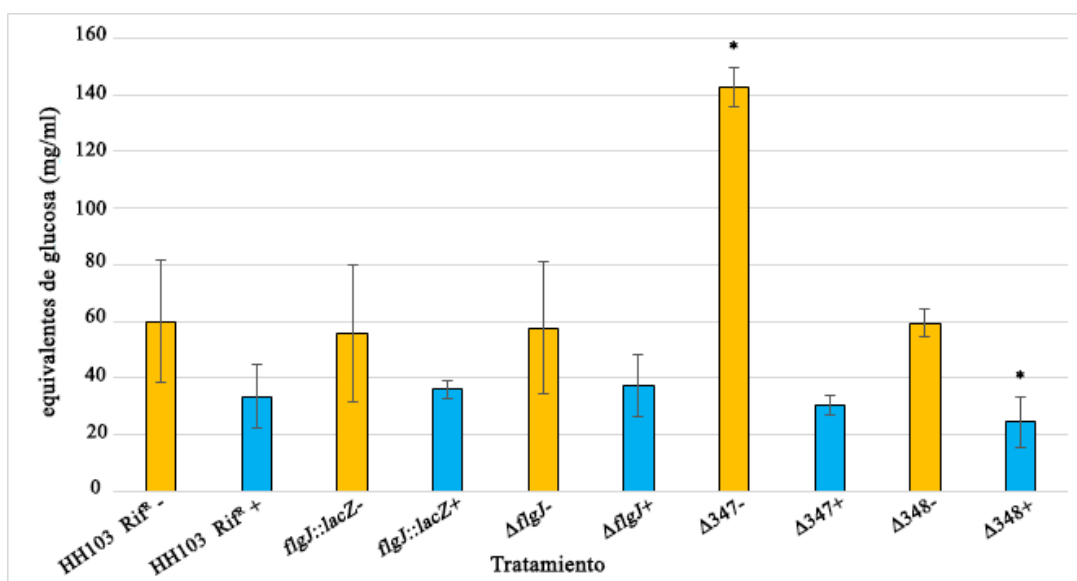


Figura 29. Equivalentes de glucosa en el medio extracelular de *S. fredii* HH103 y los mutantes *flgJ*, 00347 y 00348 en presencia (+, barras azules) y ausencia (-, barras amarillas) de genisteína. Los valores obtenidos en cada estirpe mutante se compararon individualmente con la estirpe parental en cada condición mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados por * son significativamente diferentes ($\alpha = 5\%$). Los cultivos se incubaron 96 horas y los datos representados corresponden a la media de dos experimentos con dos réplicas cada uno.

Recientemente hemos mostrado que en *S. fredii* HH103 el EPS desempeña un papel fundamental en la capacidad de formar biopelículas (*biofilms*) sobre superficies plásticas (Rodríguez Navarro *et al.*, 2014) o de vidrio (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c). Por ello, decidimos estudiar si la inactivación de estos genes afectaba a la capacidad de formar *biofilms*. Los resultados obtenidos en placas multi-pocillo de poliestireno muestran que

la presencia de genisteína reduce drásticamente la cantidad de *biofilm* formado tanto en la estirpe silvestre como en los mutantes, aunque en la estirpe $\Delta 347$ está disminución en la formación de *biofilm* es muy leve en comparación con HH103 Rif^R. En la condición control (ausencia de genisteína) los mutantes en el gen *flgJ* forman el doble de cantidad de *biofilm* que la estirpe silvestre en la misma condición, pero no hay diferencias entre HH103 Rif^R y los mutantes en los genes 00347 y 00348 (**Figura 30**).

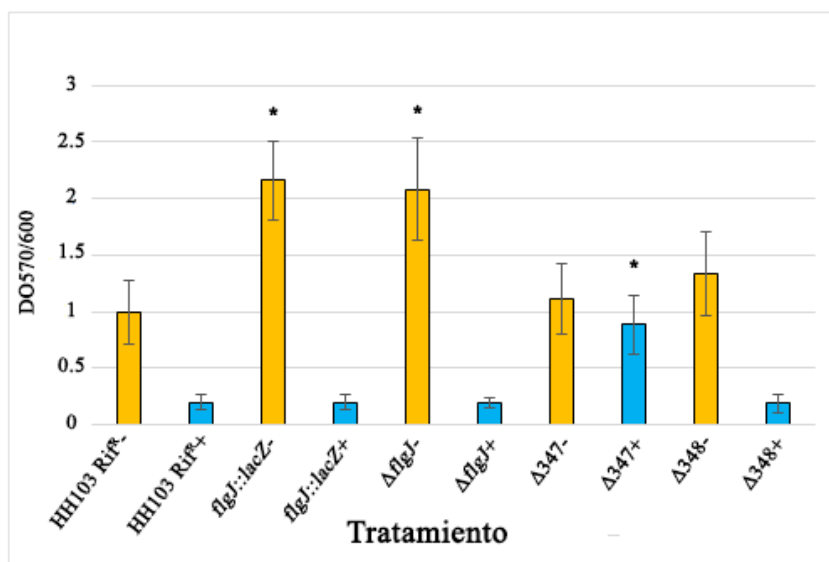


Figura 30. Capacidad de formación de *biofilm* de *S. fredii* HH103 y los mutantes *flgJ*, 00347 y 00348 crecidos en presencia (+, barras azules) o ausencia (-, barras amarillas) de genisteína. Los valores obtenidos en cada estirpe mutante se compararon individualmente con la estirpe parental en cada condición mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores marcados por * son significativamente diferentes ($\alpha = 5\%$). Los cultivos se incubaron 48 horas en estático. Los datos representados corresponden a la media de al menos tres experimentos independientes con 6 réplicas.

La formación de *biofilm* también se analizó sobre superficies de vidrio. Para ello se introdujo por conjugación el plásmido pSKDsRED (que confiere la producción constitutiva de fluorescencia roja) en *S. fredii* HH103 y en los mutantes en los genes *flgJ*, 00347 y 00348. Los cultivos en medio MGM de las diferentes estirpes con el plásmido se dispusieron en cubetas Coplin de cristal con una serie de portacristales de vidrio y se incubaron a 28 °C durante 72 horas. El *biofilm* formado en la interfase aire-líquido en cada portacristal se analizó mediante microscopía de epifluorescencia.

A las 72 horas de la inoculación se observa que todos los mutantes tienen una mayor formación de *biofilm* en la interfase aire-líquido en comparación con HH103, cuyo patrón de unión a la superficie de vidrio es más disperso (**Figura 31**).

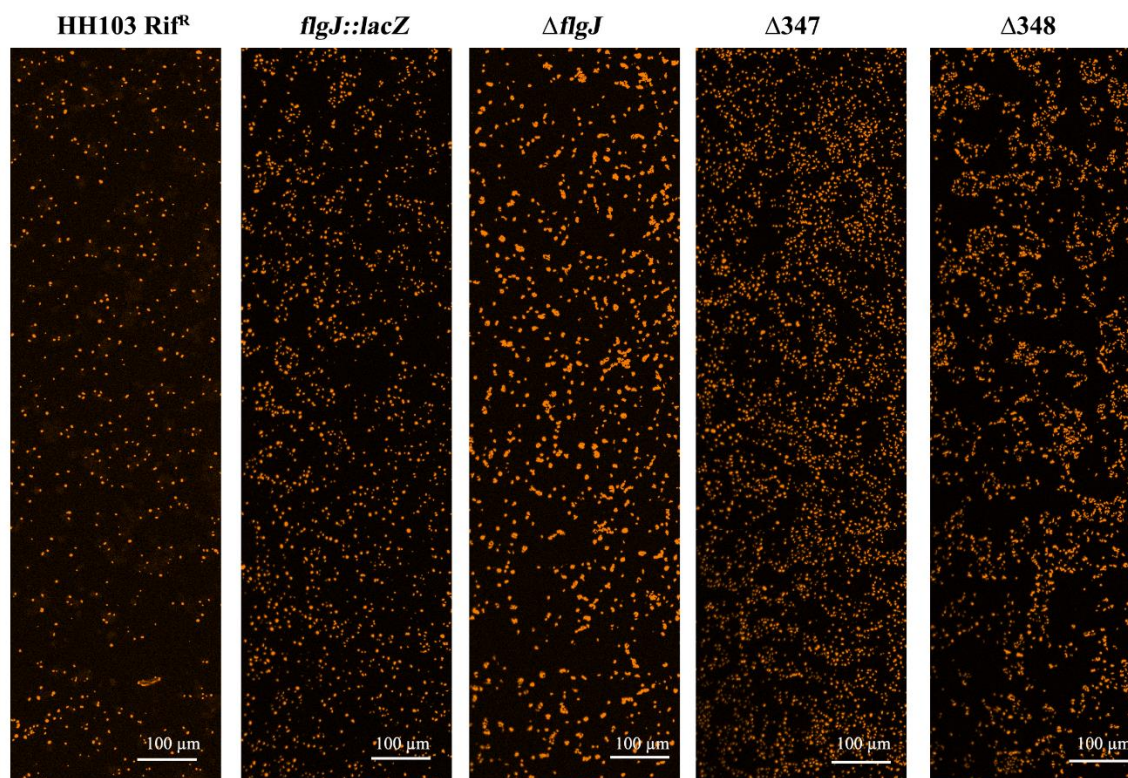


Figura 31. Capacidad formadora de *biofilm* de *S. fredii* HH103 Rif^R y los mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$ portando el plásmido pSKDsRED sobre vidrio después de 72 horas de incubación en medio MGM. La cantidad de *biofilm* se puede estimar por la fluorescencia emitida por la población de bacterias unidas. Las imágenes se tomaron a diferentes alturas del portacristal usando un microscopio de epifluorescencia Zeiss Apotome 2.0 con una longitud de onda de excitación y emisión de 554 nm y 586 nm respectivamente según lo detallado por Acosta-Jurado *et al.* (2016c). Se realizaron dos experimentos independientes con dos réplicas y se muestra una foto representativa para *S. fredii* HH103 Rif^R y cada mutante.

2.6. Estudio del LPS y KPS.

A continuación, comprobamos si los mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$ presentaban alguna alteración en la producción del lipopolisacárido (LPS) o del polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS). Ninguna de las estirpes analizadas mostró un perfil de LPS o KPS diferente al de la estirpe parental (**Figura 32**).

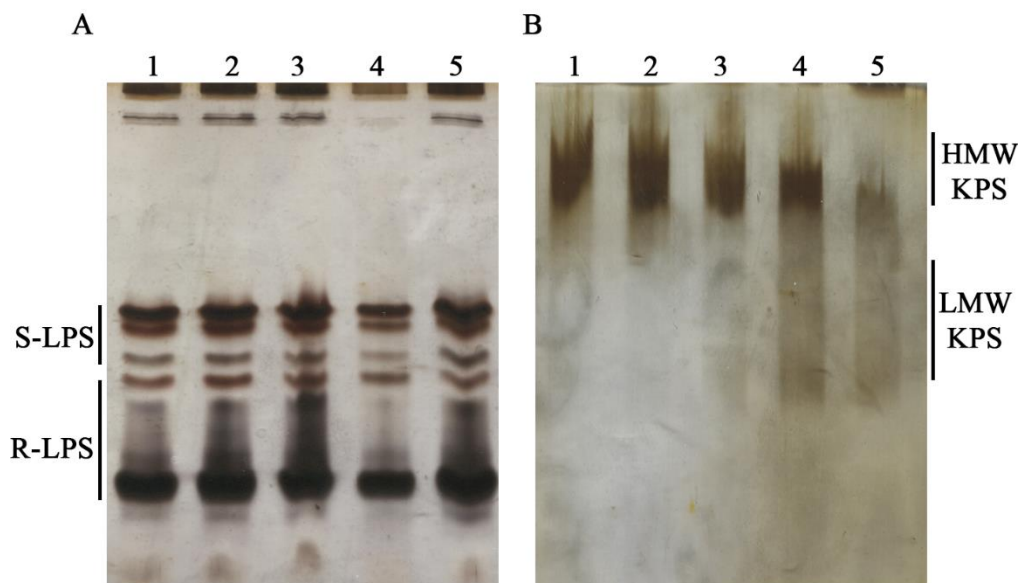


Figura 32. (A) SDS-PAGE y tinción con plata de extractos crudos de LPS y (B) PAGE y tinción con plata de extractos crudos de KPS de *S. fredii* HH103 Rif^R y sus derivados *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$. En ambos casos se indican tanto el LPS liso como el rugoso (S-LPS y R-LPS, respectivamente), al igual que el KPS de alto y bajo peso molecular (HMW-KPS y LMW-KPS, respectivamente). Carril 1, HH103 Rif^R; carril 2, *flgJ::lacZ*; carril 3, $\Delta flgJ$; carril 4, $\Delta 347$; carril 5, $\Delta 348$.

2.7. Movilidad.

Debido al papel que puede desempeñar FlgJ en la formación del flagelo en *S. fredii* HH103, se realizaron ensayos de movilidad tipo *swimming* y movilidad en superficie con los mutantes en *flgJ*, 00347 y 00348. Los ensayos de movilidad tipo *swimming* se realizaron en medio Bromfield (0,3 % de agar) suplementado con genisteína, con etanol (condición control por ser el solvente del flavonoide) o en ausencia de ambos. La movilidad en superficie se llevó a cabo en Medio Mínimo (MM; 0,4% de agarosa) suplementado con genisteína, con etanol o en ausencia de ambos. Previamente, se realizaron curvas de crecimiento en medio Bromfield y MM para descartar que las posibles diferencias en movilidad se debieran a diferencias de crecimiento en ambos medios. Las curvas obtenidas indican que no hay diferencias en el crecimiento en MM (**Figuras 33 y 34**) y Bromfield (**Figuras 35 y 36**) entre la estirpe silvestre y los mutantes.

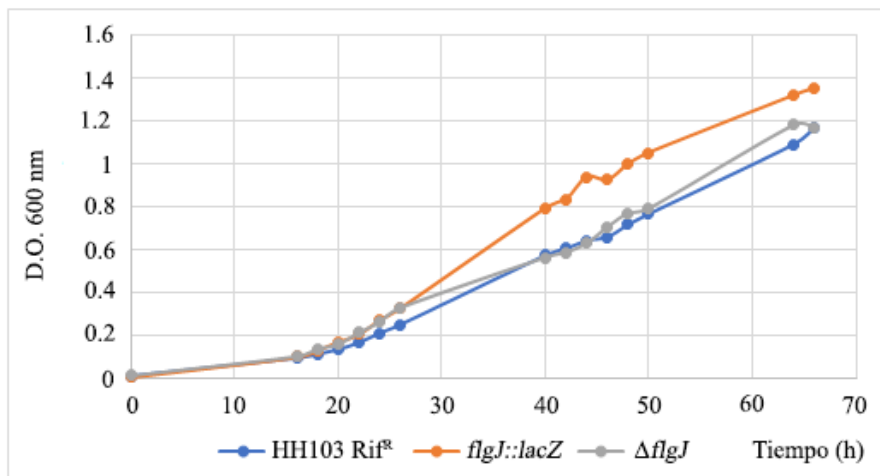


Figura 33. Curva de crecimiento de *S. fredii* HH103 Rif^R y sus derivados *flgJ::lacZ* y Δ *flgJ* en medio mínimo.

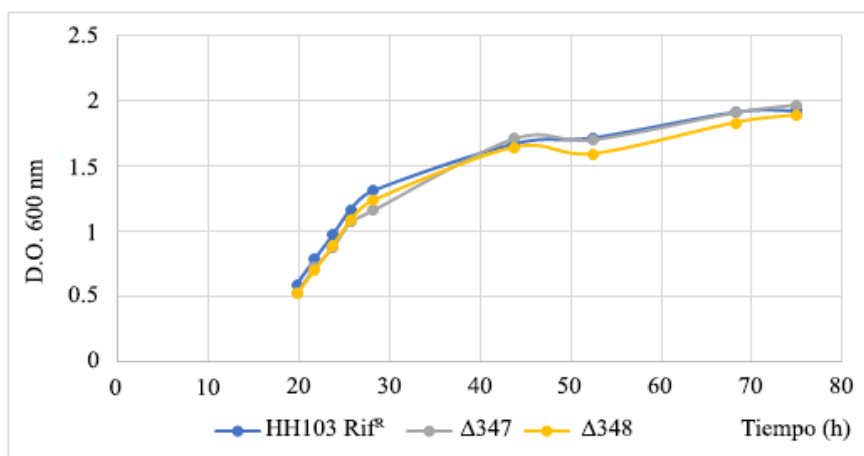


Figura 34. Curva de crecimiento de *S. fredii* HH103 Rif^R y sus derivados Δ 347 y Δ 348 en medio mínimo.

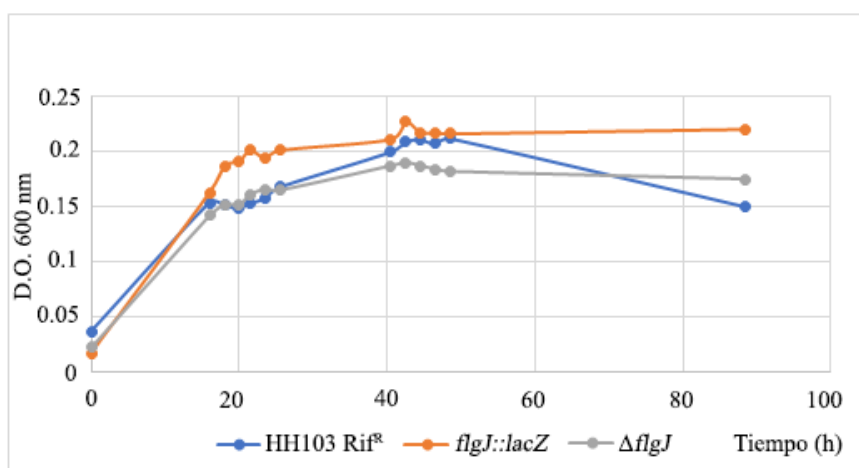


Figura 35. Curva de crecimiento de *S. fredii* HH103 Rif^R y sus derivados *flgJ::lacZ* y Δ *flgJ* en medio Bromfield.

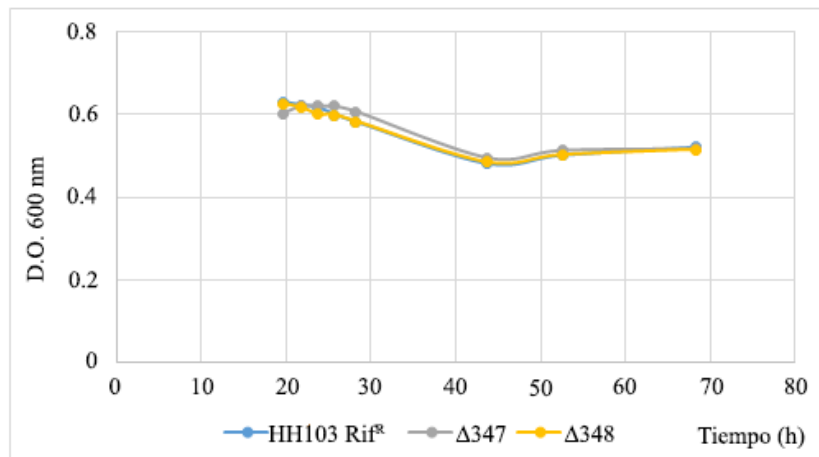
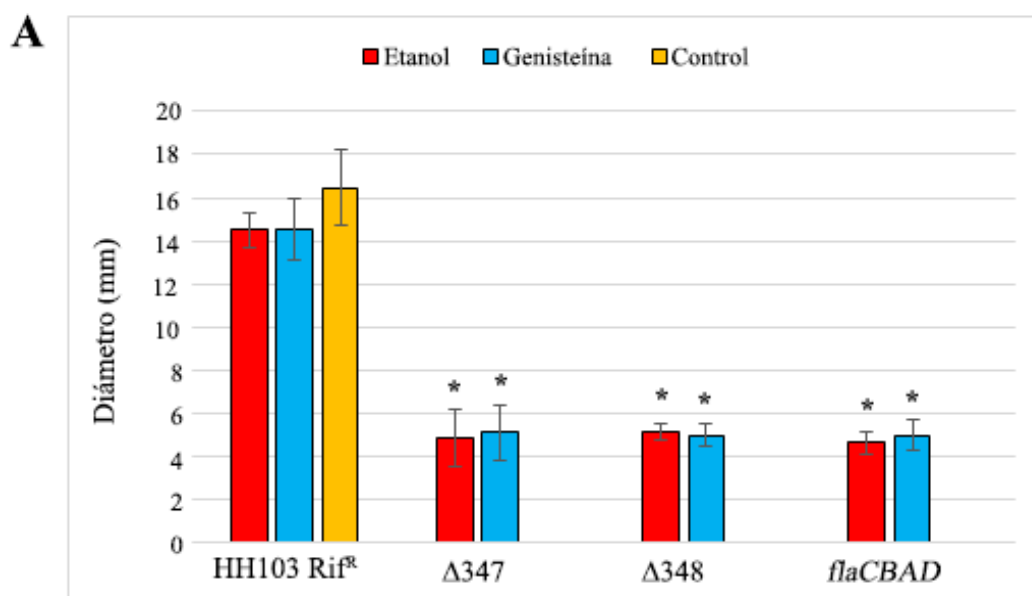
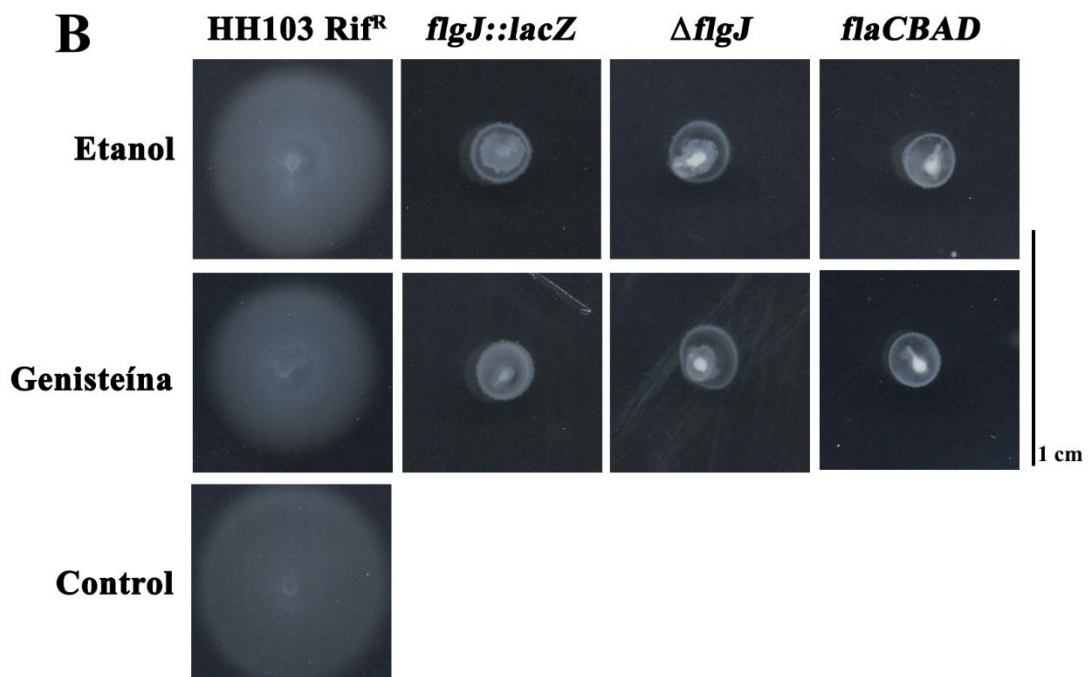
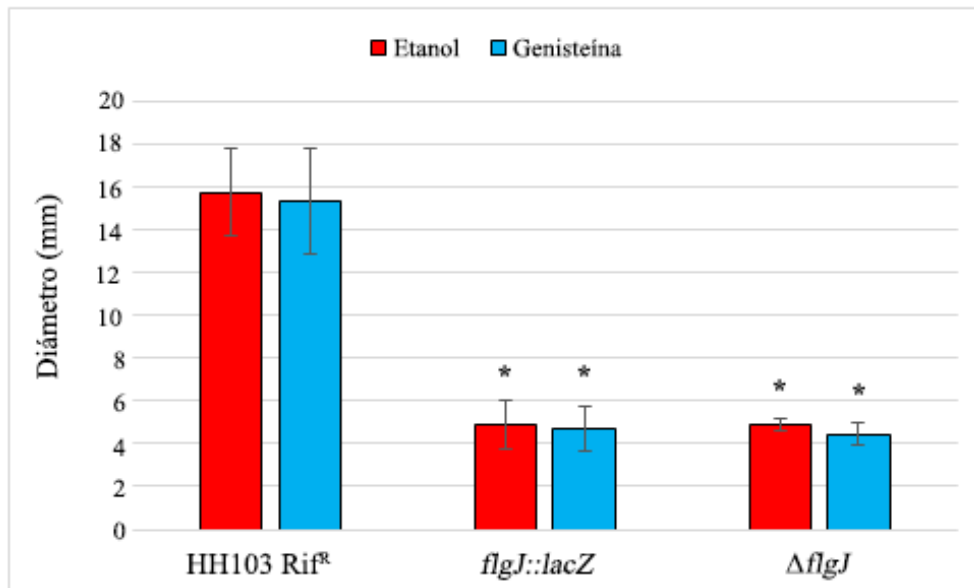


Figura 36. Curva de crecimiento de *S. fredii* HH103 Rif^R y sus derivados Δ 347 y Δ 348 en medio Bromfield.

Los resultados obtenidos muestran que, en presencia de genisteína, etanol o en ausencia de ambos (condición control) la estirpe parental HH103 Rif^R tiene una movilidad tipo *swimming* similar, por lo que se deduce que en *S. fredii* HH103 este tipo de movilidad no se afecta por la presencia de genisteína (**Figura 37**). La mutación de cualquiera de los tres genes estudiados causa una pérdida total de este tipo de movilidad en cualquiera de las tres condiciones. Las versiones complementadas de los mutantes en los genes 00347 y 00348 se incluyeron en este ensayo, y presentaron niveles de movilidad similares al de la estirpe silvestre. Como control negativo usamos un mutante desprovisto de flagelo mediante la delección de los genes *flaCBAD* (SVQ705) que, por tanto, no presenta movilidad *swimming*.





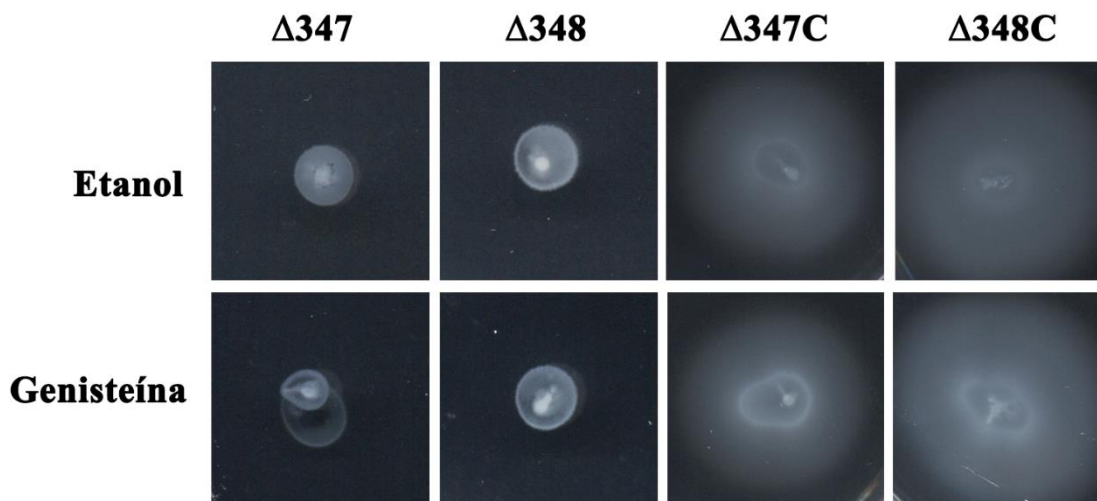


Figura 37. (A) Representación gráfica de la movilidad tipo *swimming* según el diámetro en mm del halo de movilidad y (B) ensayos de movilidad tipo *swimming* en medio Bromfield (0,3 % agar) en presencia de genisteína, etanol o, para la estirpe parental, en condición control (ausencia de ambos compuestos) en la estirpe *S. fredii* HH103 y los mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$, $\Delta 348$, $\Delta 347C$, $\Delta 348C$ y SVQ705 (*flaCBAD*). Los diámetros fueron medidos y las imágenes tomadas tras 72 horas de incubación. Los valores marcados con * en el panel A son significativamente diferentes ($\alpha = 5\%$) al valor correspondiente de HH103 Rif^R mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. El panel A representa la media de tres experimentos independientes con tres réplicas. El panel B representa imágenes de un experimento representativo.

Estos resultados se constataron mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión. Comúnmente, el género *Sinorhizobium* presenta un único flagelo polar o subpolar o de uno a seis flagelos peritricos según el *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (2015). Nuestro experimento muestra que *S. fredii* HH103 presenta un solo flagelo polar, y que dicho flagelo está ausente en los mutantes en *flgJ* y 00347 (**Figura 38**). En el mutante $\Delta 348$, en cambio, el flagelo está presente, aunque aparentemente no es funcional ya que no presenta movilidad en las placas de medio Bromfield con 0,3% de agar (**Figura 37B**; **Figura 38**).

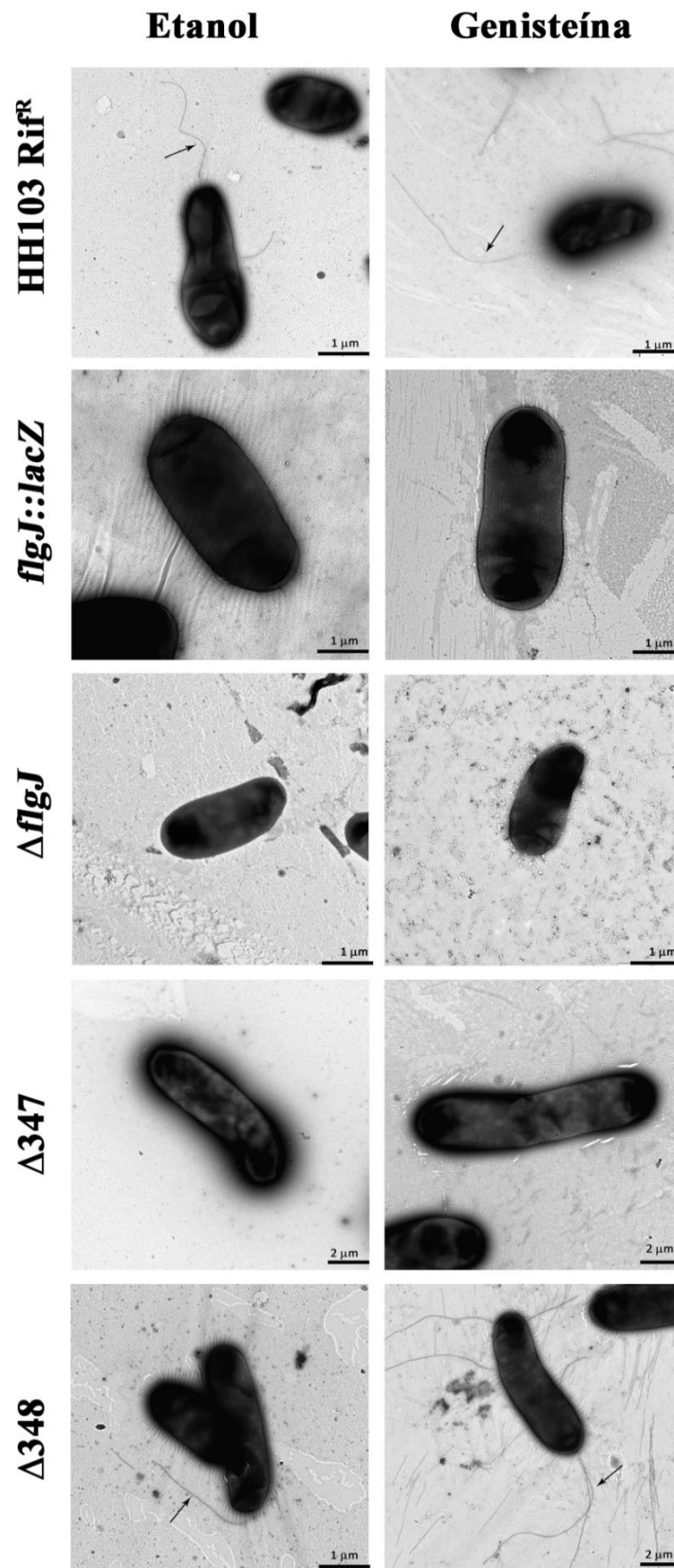
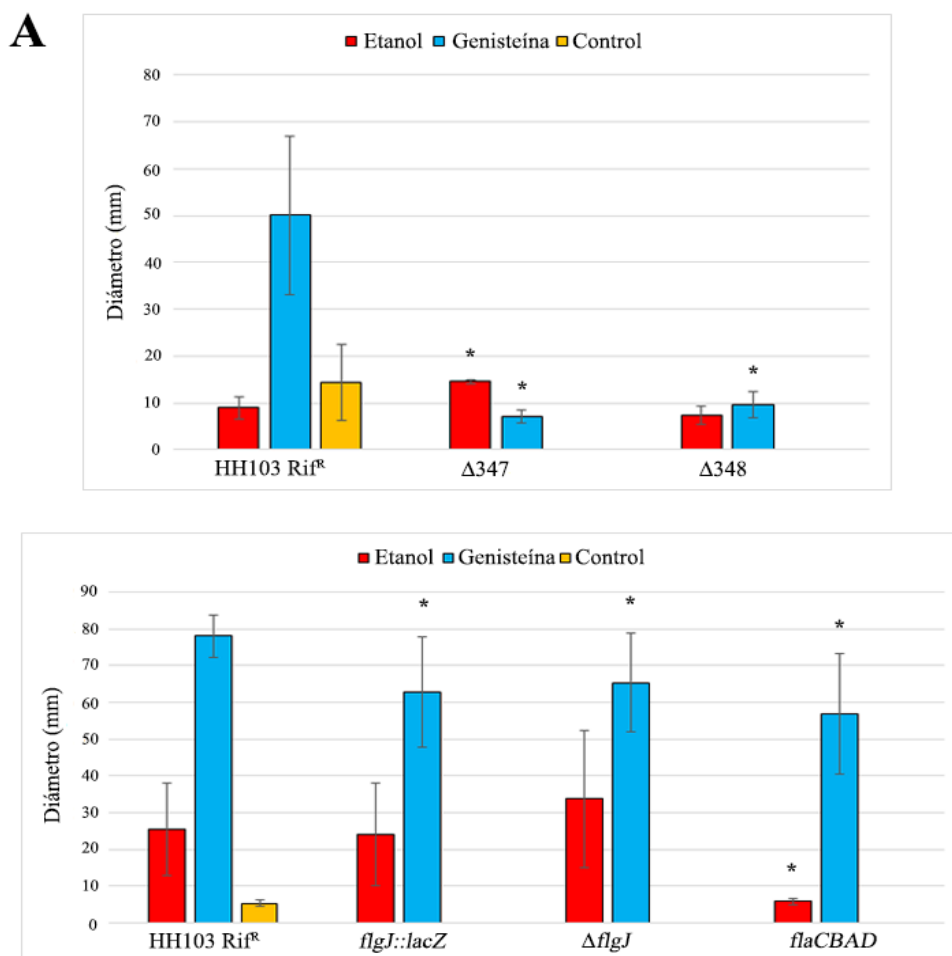


Figura 38. Imágenes del microscopio electrónico de transmisión que muestran la presencia o ausencia del flagelo en la estirpe *S. fredii* HH103 Rif^R y sus mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$ crecidos en MM semisólido. La presencia del flagelo en HH103 Rif^R y en $\Delta 348$ se indica con flechas.

En estudios previos de nuestro grupo, habíamos observado que la movilidad en superficie de *S. fredii* HH103 se incrementa notablemente en presencia de genisteína (manuscrito en preparación), por lo que decidimos realizar experimentos de movilidad en superficie con estos mutantes. Los resultados obtenidos muestran que ambos mutantes en el gen *flgJ* presentan una reducción parcial pero significativa en su movilidad en superficie en comparación con la estirpe parental cuando suplementamos el medio con genisteína, mientras que esta reducción es total en los mutantes en 00347 y 00348. Estos resultados indican que la movilidad en superficie de HH103 se debe a una combinación de movilidad tipo *swarming* (dependiente de flagelo) y a otro(s) tipo(s) de movilidad en superficie independientes de flagelo. De nuevo, utilizamos el mutante *flaCBAD* que sí presenta movilidad en superficie en presencia de genisteína, aunque es más reducida que la observada en HH103 Rif^R y similar a la de los mutantes en *flgJ* (**Figura 39**). En estos ensayos también se incluyeron los complementados de los mutantes en 00347 y 00348 y, al contrario que en *swimming*, su fenotipo no revierte al de la estirpe parental, lo que indica que la complementación es parcial (**Figura 39B**).



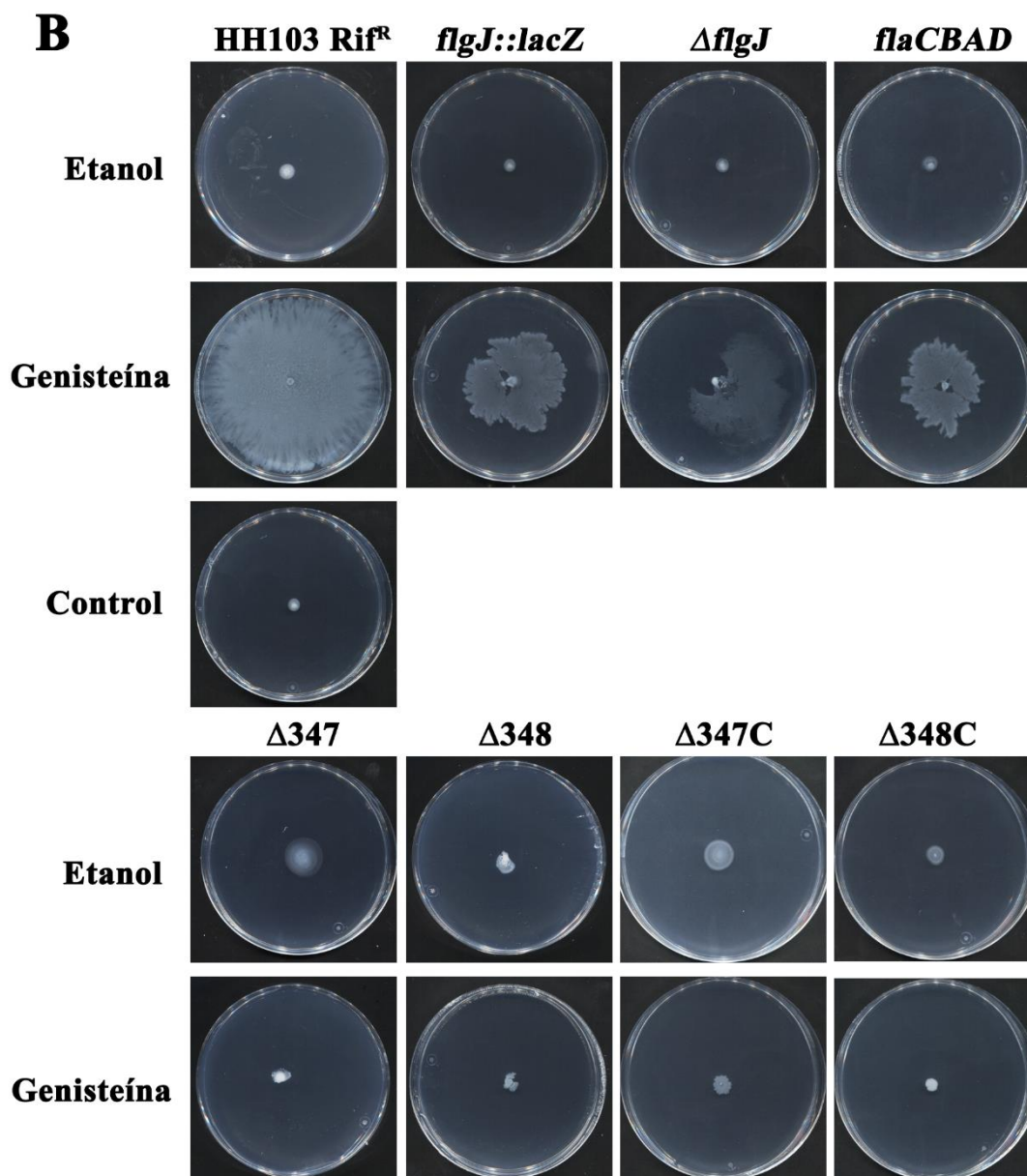


Figura 39. (A) Representación gráfica de la movilidad en superficie según el diámetro en mm del halo de movilidad y (B) ensayos de movilidad en superficie en MM (0,4 % agarosa) en presencia de genisteína, etanol o, para la estirpe parental, en ausencia de ambas (condición control) en la estirpe *S. fredii* HH103 Rif^R y sus mutantes *flgJ::lacZ*, Δ *flgJ*, Δ 347, Δ 348 y SVQ705 (*flaCBAD*). Los diámetros fueron medidos y las imágenes tomadas tras 72 horas de incubación. Los valores marcados con * en el panel A son significativamente diferentes ($\alpha = 5\%$) al valor correspondiente de HH103 Rif^R mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. El panel A representa la media de cuatro experimentos independientes con tres réplicas. El panel B representa imágenes de un experimento representativo.

2.8. Análisis del fenotipo simbiótico de los mutantes *flgJ::lacZ*, Δ *flgJ*, Δ 347 y Δ 348 de *S. fredii* HH103 en *Glycine max* cultivar Williams, *Vigna unguiculata* cv. Bisbee Red (caupí) y *Lotus burtii*.

Para estudiar el fenotipo simbiótico de los mutantes *flgJ::lacZ*, Δ *flgJ*, Δ 347 y Δ 348 en las plantas hospedadoras soja (*G. max*), *V. unguiculata* y *L. burtii*, todas formadoras de

nódulos determinados, se llevaron a cabo ensayos de nodulación. Se analizaron 3 parámetros en soja y caupí (peso seco de la parte aérea (PSPA), número de nódulos y el peso fresco de los nódulos) y 2 parámetros en *L. burttii* (peso fresco de la parte aérea y número de nódulos). Además, en *G. max* y *L. burttii*, se analizó la eficiencia fijadora de los nódulos inducidos por estos mutantes mediante un ensayo de reducción de acetileno (ARA).

Los resultados, que se muestran en la **Tabla 15**, indican que las plantas de *V. unguiculata* inoculadas con el mutante $\Delta flgJ$ tienen un peso seco de la parte aérea significativamente mayor que las inoculadas con la estirpe parental y que las mismas inoculadas con el otro mutante en este mismo gen ($flgJ::lacZ$). Aunque el número de nódulos es también mayor que el presente en las plantas inoculadas con HH103, la diferencia no es significativa. El mutante en el gen 00347 induce un aumento significativo del número de nódulos respecto a los inducidos por la estirpe parental, aunque no hay diferencias en el peso de los nódulos ni de la parte aérea de las plantas. No se observaron diferencias significativas en los parámetros medidos para las plantas inoculadas con el mutante $\Delta 348$.

Tabla 15. Respuesta de *V. unguiculata* cv. Bisbee Red (caupí) a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados $flgJ::lacZ$, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$. Se analizaron tres parámetros: peso seco de la parte aérea, número de nódulos y el peso fresco de los nódulos^{a, b}.

Inoculante (gen mutado)	Peso seco parte aérea (g) ^c	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)
HH103 Rif ^R	2,7±0,1	159,8±18,2	1553,3±141,7
SVQ801 ($flgJ::lacZ$)	3,0±0,4	174,1±19,7	1341,6±162,4
SVQ807 ($\Delta flgJ$)	3,7±0,5*	250,4±45,3	1836,3±284,9
SVQ768 ($\Delta 347$)	2,5±0,3	267,3±16,0*	1631,2±194,5
SVQ775 ($\Delta 348$)	3,1±0,5	144,8±31,6	1069,7±142,7

^a Los datos representan la media de 5 jarras Leonard, cada uno de los cuales contenía dos plantas. Las medidas se tomaron 42 días después de la inoculación. Todos los tratamientos se compararon individualmente con los valores de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota una diferencia significativa con un valor de $p < 0,05$.

^b Los datos mostrados se obtuvieron de un único ensayo de nodulación.

^c El peso seco de la parte aérea de las plantas no inoculadas fue de 0,16±0,01 g por jarro.

En *L. burttii* el comportamiento de los mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$ fue muy similar al de la estirpe parental en los parámetros analizados. Únicamente se observa un aumento significativo en el número de nódulos en el mutante $\Delta 348$ y una reducción de este número en el mutante *flgJ::lacZ*, que además se correlaciona con una disminución del peso fresco de la parte aérea de las plantas. El fenotipo simbiótico que vemos en *flgJ::lacZ* podría deberse a que muchas de las plantas inoculadas no crecieron y por lo tanto, el número de datos analizados para esta estirpe es bastante menor que los analizados en el resto de mutantes y en la estirpe silvestre. No hay diferencias en la eficiencia fijadora de nitrógeno de los nódulos en las plantas de *Lotus* inoculadas con los distintos mutantes respecto a la estirpe parental (**Tabla 16**).

Tabla 16. Respuesta de *L. burttii* a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$. Se analizaron tres parámetros: peso fresco de la parte aérea, número de nódulos y eficiencia fijadora de los nódulos ^{a, b}.

Inoculante	Número de nódulos	Peso fresco de la parte aérea (mg) ^c	Reducción de acetileno (nmoles de etileno por jarro y hora)
HH103 Rif ^R	7,8±0,8	116,0±9,3	32,2±8,4
SVQ801 (<i>flgJ::lacZ</i>)	3,3±0,3*	55,6±5,6*	18,3±3,4
SVQ807 ($\Delta flgJ$)	9,8±0,9	125,2±11,2	32,1±5,8
SVQ768 ($\Delta 347$)	8,4±0,9	114,8±10,3	29,3±4,8
SVQ775 ($\Delta 348$)	10,1±0,7*	136,0±8,9	59,5±10,1
SVQ768C ($\Delta 347C$)	8,6±0,9	156,5±22,9	28,3±12,4
SVQ775C ($\Delta 348C$)	8,2±0,7	114,5±10,2	23,2±3,1

^a Los datos representan la media de al menos 4 jarros, cada uno de los cuales contenía 4 plantas. Las medidas se tomaron 42 días después de la inoculación. Todos los tratamientos se compararon individualmente con los valores de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota una diferencia significativa con un valor de $p < 0,05$.

^b Los datos mostrados se obtuvieron de un único ensayo de nodulación.

^c El peso fresco de la parte aérea de las plantas no inoculadas fue de 40,4±2,2 mg por jarro.

Las plantas de *G. max* inoculadas con los mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$ y $\Delta 348$ indujeron la formación de un número de nódulos significativamente mayor en comparación con HH103, y en los mutantes *flgJ::lacZ* y $\Delta flgJ$, se produjo además un aumento significativo del peso fresco de los nódulos con respecto a la estirpe parental (**Tabla 17; Figura 40A, B**). Los datos mostrados en la **Tabla 17** y en la **Figura 40C**, muestran que la mutación en el gen 00347 hace que la bacteria induzca un menor desarrollo de la parte aérea, al contrario de lo que ocurre cuando estas plantas se inoculan con el mutante $\Delta flgJ$. El

ensayo de ARA realizado muestra que los nódulos inducidos por el mutante $\Delta 348$ tenían menor capacidad de fijación de nitrógeno y que, por tanto, eran significativamente menos eficientes que los nódulos de la estirpe parental. Será necesario realizar un nuevo ensayo de ARA para comprobar que hay diferencias entre los mutantes en los genes 00347 y 00348 con respecto a la estirpe parental. La complementación de la mutación en 00347 ($\Delta 347C$) no afectó el número de nódulos, pero tanto el peso fresco de los nódulos como el peso seco de las plantas fueron significativamente inferiores que los del tratamiento con HH103 (Tabla 17; Figura 40B, C). La complementación de la mutación de 00348 restauró el número de nódulos a valores similares a los obtenidos en las plantas inoculadas con HH103 (Tabla 17; Figura 40A).

Tabla 17. Respuesta de *G. max* cv. Williams a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$. Se analizaron cuatro parámetros: peso seco de la parte aérea, número de nódulos, peso fresco de los nódulos y eficiencia fijadora de los nódulos^{a, b}.

Inoculante (gen mutado)	Número de nódulos	Peso fresco de nódulos (mg)	Peso seco parte aérea (g) ^c	Reducción de acetileno (nmoles de etileno por jarro y hora)
HH103 Rif ^R	39,9±14,1	595,4±210,5	1,5±0,5	2585,3±415,5
SVQ801 (<i>flgJ::lacZ</i>)	57,2±17,2*	726,0±256,7*	1,6±0,5	2663, ±542,0
SVQ807 ($\Delta flgJ$)	57,7±16,0*	732,2±258,9*	1,9±0,5*	2834,4±293,2
SVQ768 ($\Delta 347$)	42,2±14,9	525,4±185,7	1,0±0,3*	1091,3±38,5*
SVQ775 ($\Delta 348$)	54,1±19,1*	797,1±281,8	1,8±0,7	990,1±98,3*
SVQ768C ($\Delta 347C$)	35,8±12,7	415,4±146,9*	0,9±0,3*	2510,4±573,5
SVQ775C ($\Delta 348C$)	42,3±15,0	669,4±236,7	1,6±0,5	2010,1±421,7

^a Los datos representan la media de 5 jarros Leonard, cada uno de los cuales contenía dos plantas. Las medidas se tomaron 42 días después de la inoculación. Todos los tratamientos se compararon individualmente con los valores de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota una diferencia significativa con un valor de $p < 0,05$.

^b Los datos de Reducción de acetileno se obtuvieron de un único ensayo de nodulación. El resto de datos mostrados muestran un experimento representativo de tres realizados.

^c El peso seco de la parte aérea de las plantas no inoculadas fue de $0,5 \pm 0,2$ g por jarro.

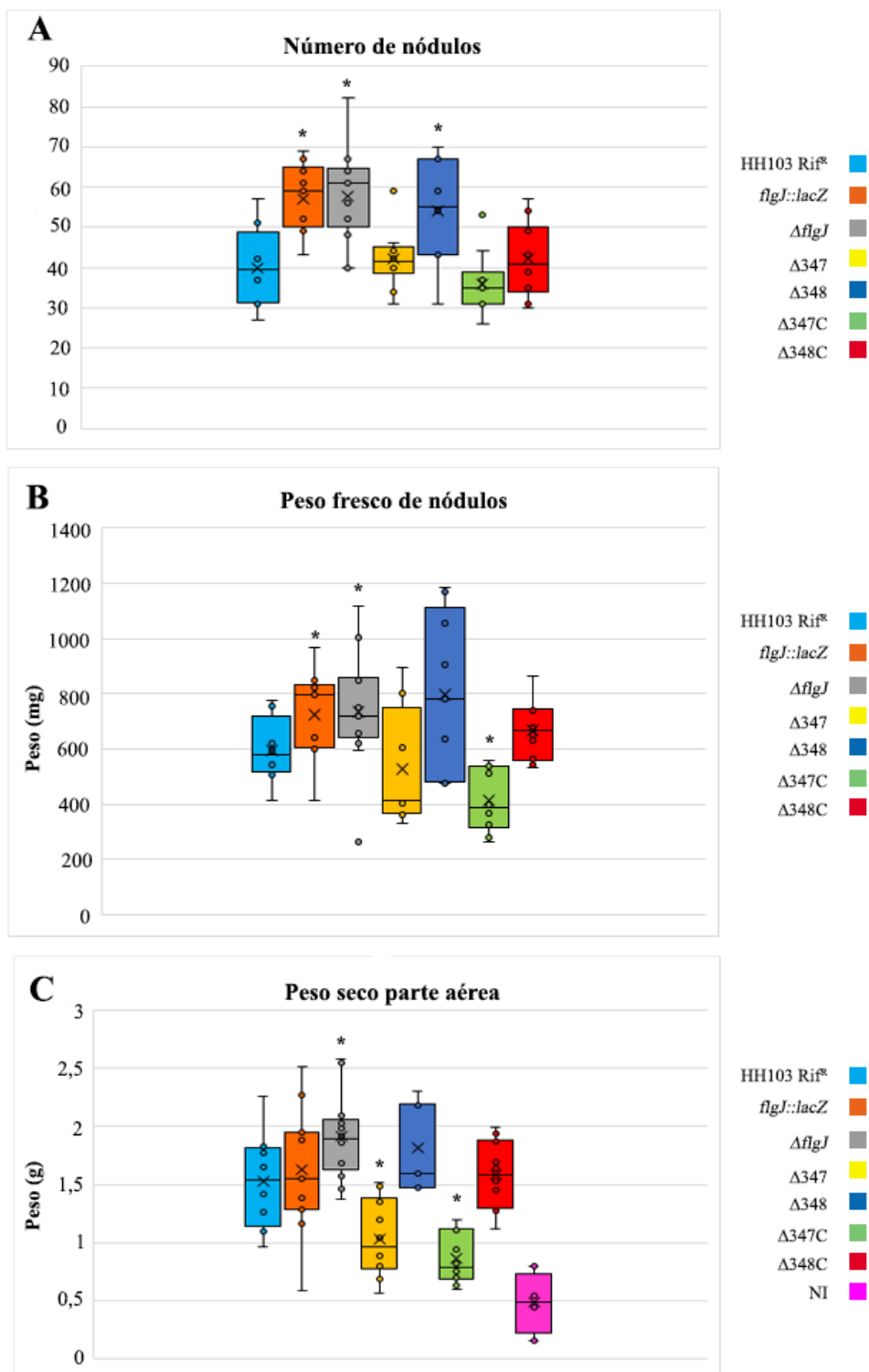


Figura 40. Fenotipo simbiótico de *S. fredii* HH103 Rif^R y sus mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$, $\Delta 348$, $\Delta 347C$ y $\Delta 348C$ en *G. max* cv. Williams. Las barras indican el valor máximo y mínimo de los datos representados. Los círculos son cada uno de los datos representados y la “x” la media de estos datos. La línea del interior de la caja es la mediana, el punto en el que el 50% de los valores representados están por debajo y por encima de este punto. Los datos representan la media de 5-6 jarros con 2 plantas por cada jarro. Los nódulos y la parte aérea se recogieron a los 42 dpi. Cada mutante se comparó con la estirpe parental HH103 usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota diferencias significativas con respecto a la estirpe parental con un nivel de $\alpha=5\%$.

2.9. Doble híbrido

De cara a estudiar posibles interacciones entre las proteínas codificadas por los genes *flgJ*, 00347 y 00348, llevamos a cabo ensayos de doble híbrido. Para ello, primero se clonaron en fase los genes *flgJ*, 00347 y 00348 en los plásmidos del kit *Bacterial Adenylate Cyclase TwoHybrid System* de Euromedex (pKT25, pKNT25, pUT18 y pUT18C) utilizando los sitios de restricción de las enzimas *KpnI* y *XbaI*. Los cebadores usados para dichas construcciones se recogen en la **Tabla 6**. Todas las construcciones obtenidas se comprobaron tanto por PCR de colonias como por secuenciación.

Se analizaron las distintas interacciones posibles, tanto de las diferentes proteínas entre ellas (por si formaban heterodímeros), como consigo mismas (por si formaban homodímeros). Para cada pareja se analizaron todas las combinaciones posibles (8 por cada pareja de proteínas a estudiar, evitando así posibles problemas alostéricos debido a la fusión de las proteínas problema con las reporteras).

Las células co-transformadas se sembraron en placas de LB con los antibióticos de selección de ambos plásmidos y X-Gal como sustrato revelador de la interacción y se dejaron incubar 24 horas a 30°C. Las colonias resultantes de las co-transformación (no mostradas) tenían color blanco, al igual que los controles negativos, lo que sugería que ninguna de las proteínas estudiadas interacciona con las otras o consigo misma.

El siguiente paso de esta metodología consiste en disponer gotas de cultivos crecidos de colonias co-transformadas en placas de LB suplementado con ampicilina, kanamicina, X-Gal e IPTG y en placas de medio McConkey suplementado con los mismos antibióticos. Estos resultados fueron idénticos a los obtenidos con anterioridad con excepción de la interacción de la proteína FlgJ consigo misma, en la que la gota adquirió color azul en la placa de LB y ligeramente rosado en la de medio McConkey, aunque es un rosa muy pálido si se compara con el del control positivo. De estos resultados deducimos estas proteínas no interaccionan entre ellas formando heterodímeros u homodímeros, menos en el caso de FlgJ en el que esta proteína podría formar un homodímero mediante una interacción débil (**Figura 41**).

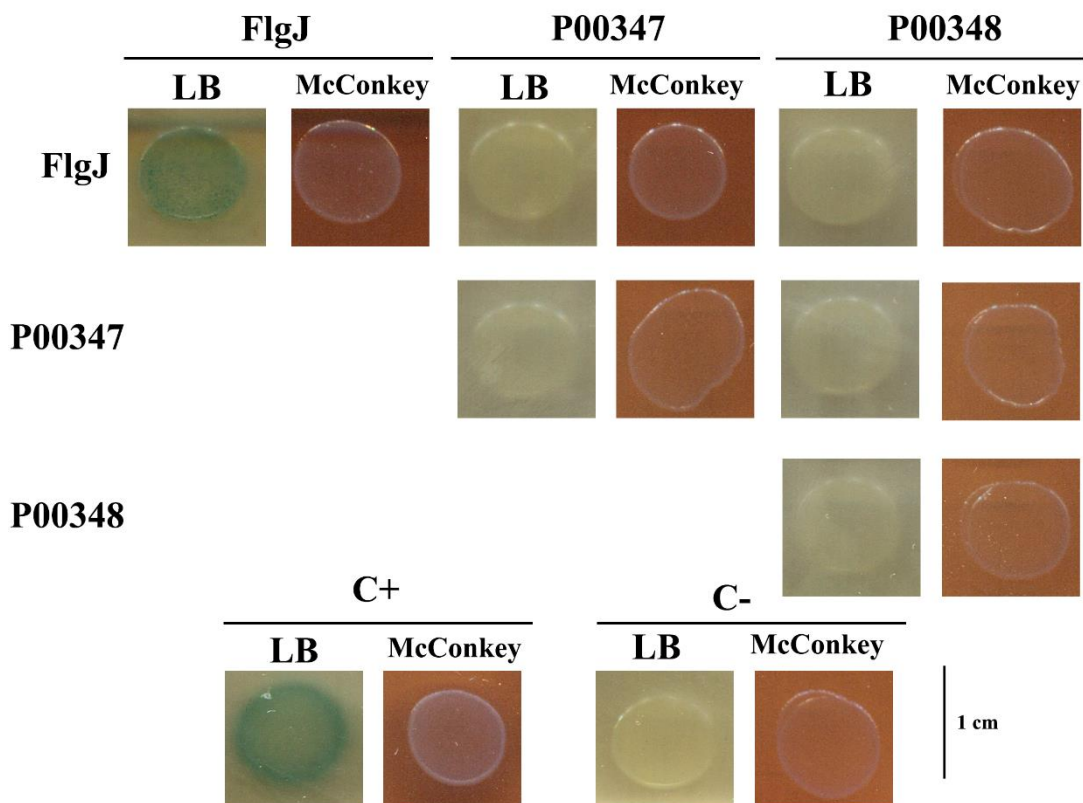


Figura 41. Ensayo de doble híbrido. Las gotas se dispusieron en placas de LB suplementadas con Kanamicina (Km), Ampicilina (Ap), X-Gal e IPTG y en medio McConkey suplementado con Km y Ap. Como control positivo se utilizaron los plásmidos pUT18C-zip y pKT25-zip. Como control negativo se utilizaron los plásmidos pUT18C ó pKT25 vacíos.

3. Discusión.

Los estudios transcriptómicos (RNAseq) llevados a cabo en nuestro laboratorio han revelado que la genisteína, un flavonoide inductor de los genes de nodulación en *S. fredii* HH103, afecta la expresión de 100 genes (*fold change* ± 3), muchos de los cuales aún no han sido caracterizados en rizobios. Asimismo, diversos estudios realizados en nuestro laboratorio muestran que la genisteína no sólo induce la producción de factores Nod y la secreción de Nops, sino que también reprime la producción de EPS (Acosta-Jurado *et al.*, 2016a) y potencia la movilidad en superficie (manuscrito en preparación).

Entre los genes de HH103 diferenciablemente expresados (DEGs) en presencia de flavonoides aparece un grupo de tres presentes en el cromosoma: *flgJ*, 00347 y 00348. Aunque estos genes se habían incluido inicialmente en el grupo de DEGs carentes de NB y TB (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b), los análisis *in silico* de la posible región promotora de *flgJ* revelaron la presencia de dos posibles cajas reguladoras, aunque ambas con diferencias con las respectivas secuencias consenso: una TB y una SB, a 152 y 803 pb del inicio de traducción de *flgJ*, respectivamente. Los estudios realizados en esta Tesis

mediante fusión de fragmentos con estas cajas con un gen *lacZ* carente de promotor, muestran que esta TB, a pesar de diferir de la secuencia consenso (Vinardell *et al.*, 2015), es claramente funcional, lo que junto con el hecho de que estos tres genes dejen de inducirse por genisteína en un fondo *ttsI* (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b), confirman que su expresión está regulada por NodD1 y TtsI a través de dicha TB. El hecho de que la expresión dependiente de esa TB decrezca en un fondo *nodD2* podría indicar una posible influencia positiva de NodD2 en la expresión de estos genes, en contradicción con el efecto claramente represor de NodD2 mostrado por los datos de *RNAseq*, aunque en este momento desconocemos el mecanismo por el cual se ejercería. Curiosamente, cuando se analiza el fragmento que, además de la caja TB, contiene la posible caja SyrM, la expresión del gen informador (*lacZ*) se reduce notablemente en la estirpe silvestre tanto en ausencia como en presencia de genisteína, lo cual podría señalar un posible efecto represor de SyrM en línea con lo observado en estudios de *RNAseq*. Sin embargo, con el fragmento que contiene ambas cajas, la expresión del gen informador se reduce significativamente en presencia de flavonoide en un fondo carente de este regulador. Además, cuando están presentes tanto la SB como la TB, no se observa el efecto positivo de NodD2 y sí una leve represión por NoIR. Una posibilidad es que el fragmento que contiene ambas cajas “funcione peor” debido a su tamaño y a contener el gen precedente (SFHH103_00345) y un 50% del anterior (SFHH103_00344). De hecho, esta SB está localizada muy lejos del inicio de transcripción que revela el mapeo de lecturas de los experimentos de *RNAseq*, todo lo contrario que la TB (**Figura 42A**). En cualquier caso, también con esta construcción se confirma la regulación positiva por NodD1 y TtsI en presencia de flavonoides mediada por la TB localizada 152 pb antes del inicio de traducción de *flgJ*. Por el contrario, los experimentos realizados hasta ahora no han permitido obtener resultados concluyentes de la funcionalidad de la SB.

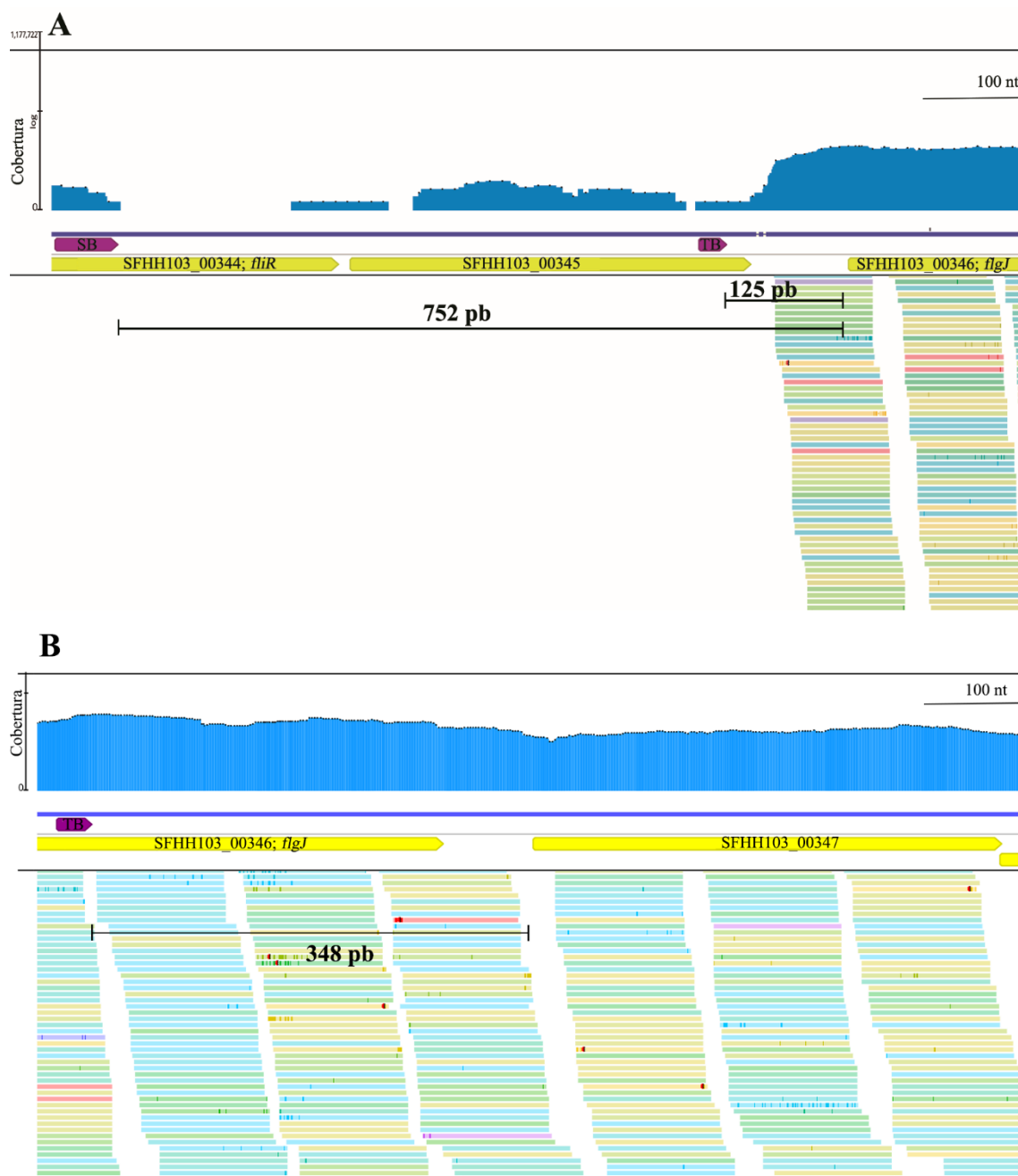


Figura 42. Mapa de transcritos en presencia de genisteína donde se indica la localización de (A) la TB y SB con respecto al punto de inicio de la traducción de *flgJ* y (B) de la TB aguas arriba del gen 00347.

Los estudios de RNAseq llevados a cabo por nuestro grupo confirman el papel positivo de NodD1 y TtsI y muestran un papel negativo de NodD2, NolR y SyrM en la expresión (medida como niveles de transcrito) de los genes *flgJ*, 00347 y 00348 (Pérez-Montaño *et al.*, 2016b; Acosta-Jurado *et al.*, 2020) (Tabla 18). Además, el análisis transcriptómico de estos genes en presencia de exudados radicales de *L. japonicus* Gifu muestra que tanto NodD2 como NolR reprimen la expresión de *flgJ*, 00347 y 00348 (Acosta-Jurado *et al.*, 2019) (Tabla 19). El efecto negativo de NodD2 y SyrM sobre este grupo génico podría

deberse a la presencia de la SB imperfecta localizada 817 pb antes del inicio de traducción de *flgJ*. No obstante, como se ha reflejado antes, los datos del efecto de SyrM sobre la transcripción de *flgJ* obtenidos por fusiones con *lacZ* son contradictorios: menor expresión cuando están presentes las dos posibles cajas respecto a la fusión con el fragmento que solo contienen la TB (lo que indicaría un efecto represor de SyrM), pero menor expresión en el primer caso cuando SyrM no está presente (lo que indicaría un efecto activador de SyrM). Es posible que el papel negativo de SyrM, NodD2 y NolR se ejerza regulando la estabilidad de los mensajeros (quizás de modo indirecto, ya que son reguladores transcripcionales) en vez de a nivel de transcripción de estos genes, pero esclarecer esta cuestión requiere más investigación. En cualquier caso, el análisis de la región de 1020 pb antes del codón de inicio de *flgJ* no revela la presencia de NolR *boxes*.

Tabla 18. Datos de RNAseq sobre los niveles de expresión de *flgJ*, 00347 y 00348 en diferentes fondos mutantes en presencia de genisteína. Los valores de *fold change* están referidos a la expresión de la estirpe silvestre crecida en ausencia de genisteína.

<i>Fold change</i>						
Nombre del gen	WT -	Mutante <i>nodD1</i> +	Mutante <i>ttsI</i> +	Mutante <i>nolR</i> +	Mutante <i>nodD2</i> +	Mutante <i>syrM</i> +
SFHH103_346/ <i>flgJ</i>	7,6	1,0	2,1	59,6	59,8	20,2
SFHH103_347	7,0	1,0	1,5	39,7	43,9	15,2
SFHH103_348	4,3	1,2	1,2	15,5	14,8	5,6

Tabla 19. Datos de RNAseq sobre los niveles de expresión de *flgJ*, 00347 y 00348 en los fondos mutantes NolR y NodD2 en presencia de exudados radicales de *L. japonicus*. Los valores de *fold change* están referidos a la expresión de la estirpe silvestre crecida en ausencia de exudados.

<i>Fold change</i>			
Nombre del gen	WT-	Mutante <i>nodD2</i> +	Mutante <i>nolR</i> +
SFHH103_346/ <i>flgJ</i>	36,4	109,6	108,6
SFHH103_347	43,4	136,4	83,7
SFHH103_348	18,8	45,1	33,3

El hecho de que los genes *flgJ*, 00347 y 00348 presenten una regulación común en presencia de flavonoide sugiere que podrían constituir un operón. Sin embargo, los estudios de RT-PCR realizados en esta Tesis no muestran la presencia de un ARNm común a los genes *flgJ* y 00347 aunque sí se detecta un transcrito común para los genes 00347 y 00348. Sin embargo, la visualización del mapeo de las lecturas de RNAseq de estos tres genes refuerza la idea de que la presencia de genisteína induce simultáneamente la expresión de los tres genes. Este hecho nos llevó a analizar si pudiera existir alguna secuencia reguladora precediendo a 00347. Hallamos una posible TB 348 pb aguas arriba del inicio de traducción de este gen (**Figura 42B**) aunque su secuencia difiere notablemente de la secuencia consenso de HH103 (**Figura 43**) y que podría estar controlando la expresión de 00347. Será necesario analizar la expresión de este gen en el mutante $\Delta flgJ$ en presencia de genisteína para comprobar si la TB es funcional y si, por tanto, la regulación conjunta de estos tres genes depende de TtsI ó si podría explicarse porque algún otro regulador distinto activase la expresión de 00347 y 00348 en presencia de genisteína. En cualquier caso, dicho regulador debería depender a su vez de TtsI, ya que en un fondo *ttsI* se abole la expresión diferencial de 00347 y 00348 por la presencia de genisteína.

Secuencia consenso de las TB de HH103	GTACGN5CGN2AGN10TA
Secuencia de la TB que precede a 00347	GTAAGN5CGN2ATN10AA

Figura 43. Comparación de la secuencia consenso nucleotídica de las TB de *S. fredii* HH103 con la TB localizada aguas arriba de 00347. En rojo se muestran aquellos nucleótidos que son diferentes.

Otra posibilidad es que los genes *flgJ*, 00347 y 00348 sí se cotranscriban pero que, una vez generado el ARNm policistrónico, la zona correspondiente a *flgJ* se procese y traduzca por separado de la de los otros dos genes. Por otro lado, también podría haber una diferencia de viabilidad en la zona del ARNm que corresponde a *flgJ* y 00347-00348, por lo que en función de los resultados de expresión diferencial, la zona correspondiente a *flgJ* tendría una vida media menor ya sea por una menor estabilización del mensajero o la actuación de ARNasas sobre esta región (Becker *et al.*, 2014). Para estudiar esa posibilidad serían necesarios estudios de RACE para ver si encontramos un sitio +1 para 00347 independiente de *flgJ* y/o estudios de tiempos de vida media del ARNm de la región correspondiente a *flgJ* y 00347-00348.

De este grupo de tres genes, sólo la función de *flgJ* parece perfectamente definida. En β - y en γ -proteobacterias, FlgJ tiene una doble función, como andamiaje de la varilla flagelar y como enzima con actividad glucosaminidasa para facilitar la penetración de la varilla (Nambu *et al.*, 2006). En α -proteobacterias, como *R. sphaeroides*, FlgJ actúa solo como proteína de andamiaje ya que carece del dominio muramidasa y es la proteína SltF la que tiene actividad transglicosilasa lítica para formar el orificio en el PG para que pueda salir la varilla del flagelo hacia el exterior celular (de la Mora *et al.*, 2007). Muy probablemente esto es lo que ocurre también en *S. fredii* HH103, en la que la proteína SltF está codificada por el gen SFHH103_00334. Este gen forma parte de un operón relacionado con la movilidad que incluye los genes *motC* y *motD* (SFHH103_00330-00334), presenta unos niveles basales de expresión muy bajos salvo en el mutante *mucRI* (del cual disponemos de estudios de RNAseq; Acosta-Jurado *et al.*, 2016c). La mutación del gen *mucRI* provoca una inducción diferencial de los genes relacionados con la movilidad incluyendo el operón 00330-00334 (*fold change* de +6,1, +3,1, +4,9 y +4,8, respectivamente) por lo que, aunque el gen SFHH103_00334 no se induzca en la estirpe silvestre en presencia de flavonoides, no se puede descartar que realice la función de transglicosilasa en condiciones que aún desconocemos. Además, la inactivación de *mucRI* y la presencia de genisteína, aumenta la expresión de los genes *flgJ*, 00347 y 00348 en comparación con la estirpe parental en la misma condición obteniendo unos valores de *ratio* de +2,14, +2,62 y +1,50, respectivamente.

La inactivación de *flgJ* en HH103 impide la síntesis del flagelo y, por tanto, abole la capacidad natatoria de la bacteria. Sin embargo, sólo afecta parcialmente, y de modo negativo, a la capacidad de movimiento en superficie, que en esta estirpe es claramente estimulado por la presencia de flavonoides. Este hecho indica claramente que en el movimiento en superficie de HH103 operan distintos mecanismos, uno de los cuales es *swarming* ya que es dependiente de flagelo.

Los genes 00347 y 00348 codifican proteínas hipotéticas, pero ambas presentan similitudes estructurales con proteínas relacionadas con el flagelo en otras bacterias. El estudio *in silico* del producto del gen 00347 utilizando el programa Phyre² reveló que tiene una estructura muy similar a la chaperona FlgN de *Bordetella pertussis* (**Figura 44A**). En *S. typhimurium* FlgN es una chaperona específica para las proteínas FlgK y FlgL que forman la unión entre el gancho y el filamento en el flagelo y proporcionan una base estructural donde se inserta la flagelina para iniciar el alargamiento del filamento (Hong *et al.*, 2018). Se ha observado por microscopía que la mayoría de las estructuras

flagelares producidas por el mutante en *flgN* son complejos cuerpo basal-gancho que carecen de ciertas partes del filamento, por lo que, en esta bacteria el producto de *flgN* es necesario para que el inicio del ensamblaje del filamento flagelar tenga lugar de manera adecuada (Kutsukakea *et al.*, 1994). Además, el análisis *in silico* de *Bacillus subtilis* sugiere que la proteína YvyG, ortóloga a FlgN de *S. typhimurium*, es esencial para la polimerización del filamento flagelar y, por tanto, para la movilidad tipo *swimming* y *swarming* (Cairns *et al.*, 2014). El programa Phyre² también reveló que la estructura de la proteína codificada por 00348 es similar a la de la proteína FliL de *V. alginolyticus*, aunque sólo con una cobertura del 50% (**Figura 44B**). FliL es una de las proteínas menos caracterizadas del cuerpo basal flagelar y ha sido investigada en varias especies de γ -proteobacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Proteus mirabilis*, además de *V. alginolyticus*, pero la información en α -proteobacterias es escasa (Mengucci *et al.*, 2019). FliL es esencial para la movilidad tipo *swimming* de *Caulobacter crescentus* y *R. sphaeroides*, así como para el *swarming* de *E. coli* y *Salmonella*, mientras que la delección de FliL no afecta de forma drástica al *swimming* de *E. coli*, *Salmonella*, *B. subtilis*, *Borrelia burgdorferi*, *P. mirabilis* y *V. alginolyticus* (Takekawa *et al.*, 2019). Parece ser que FliL podría participar, junto con otras proteínas, en la activación del canal de protones necesario para el movimiento del flagelo (Fabela *et al.*, 2013).

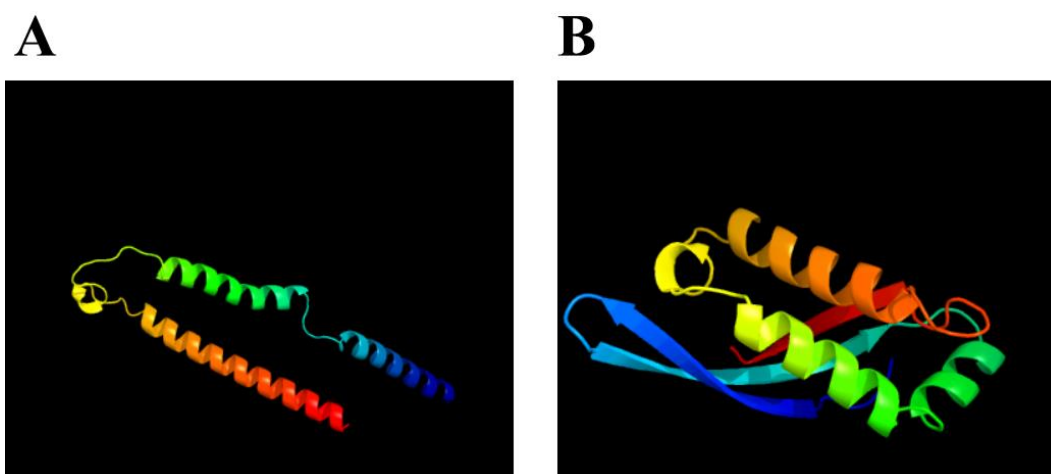


Figura 44. Estructura de los productos de los genes (A) 00347 y (B) 00348.

El *swimming* es un movimiento dependiente de flagelo que se da en medios acuosos y en superficies que presentan un fluido denso sobre ellas (Harshey, 1994). En experimentos previos hemos visto que *S. fredii* HH103 presenta este tipo de movilidad y que es independiente de genisteína. Los mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$ no tienen movilidad de tipo *swimming* en ninguna de las condiciones estudiadas, algo que

también observamos en el mutante aflagelado ($\Delta flaCBAD$) utilizado como control negativo. Cuando se complementa la mutación en 00347 y 00348, se restaura este fenotipo y el halo de movilidad es igual al de la estirpe parental. Estos resultados se correlacionan con los estudios de microscopía llevados a cabo por la Dra. Alías Villegas, donde se observa que los mutantes en *flgJ* y 00347 carecen de flagelo, y que el mutante $\Delta 348$ sí lo tiene, aunque los estudios de *swimming* muestran que no es funcional. Como describimos previamente, 00348 tiene una estructura parecida a la de la proteína FliL de *R. sphaeroides* y se ha visto que en ausencia de FlgT (una proteína que interacciona con FliL) las células son capaces de ensamblar el flagelo, pero son inmóviles (Fabela *et al.*, 2013). Por tanto, la inactivación de 00348 podría estar impidiendo la interacción con otra proteína implicada en la función motora del flagelo, dando lugar a células flageladas que carecen de movilidad. Ni FlgT ni ninguna proteína ortóloga a esta, está presente en *S. fredii* HH103. Por otro lado, en presencia de genisteína, *S. fredii* HH103 incrementa notablemente su movilidad en superficie. Los mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$ y $\Delta flaCBAD$ sí tienen este tipo de movilidad aunque significativamente reducida en comparación con la observada en HH103. Los mutantes $\Delta 347$ y $\Delta 348$, en cambio, carecen completamente de movilidad en superficie en presencia de genisteína, lo que indica que estos dos genes son esenciales para que la bacteria pueda moverse en superficie en presencia de genisteína. Estos resultados indican: i) *S. fredii* HH103 presenta diversos mecanismos de movilidad en superficie, siendo uno de ellos *swarming* (dependiente de flagelo); ii) FlgJ interviene en la movilidad en superficie tipo *swarming* de HH103, pero su ausencia no impide la movilidad en superficie vía otros tipos de movimientos; iii) La carencia tanto de 00347 como de 00348 abole totalmente cualquier tipo de movilidad, lo que sugiere que sus funciones pueden ser necesarias independientemente del tipo de movilidad a realizar. De este modo, ambas proteínas serían un punto en común en la maquinaria de todos los tipos de movilidad llevados a cabo por la bacteria. Sería interesante en un futuro estudiar qué tipos de movilidad en superficie tiene *S. fredii* HH103, qué más genes podrían estar implicados y qué papel desempeñan en todo esto 00347 y 00348.

Además, en nuestro grupo se han realizado estudios de movilidad en superficie en algunos mutantes en genes reguladores de *S. fredii* HH103: *nodD1*, *nodD2*, *nolR*, *ttsI*, *syrM* y *mucR1* (manuscrito en preparación). La presencia de genisteína incrementa notablemente la movilidad en superficie de *S. fredii* HH103 y de los mutantes en *nodD2* y *syrM*. El mutante *mucR1*, al igual que hemos visto que ocurre en los mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$ y $\Delta flaCBAD$, presenta este incremento de movilidad en presencia de

genisteína aunque significativamente reducida en comparación con la observada en HH103, mientras que en los mutantes en *nodD1*, *ttsI* y *nolR* no se observa movilidad en superficie en esta condición. El hecho de que los mutantes *nodD1* y *ttsI* carezcan de movilidad en superficie podría estar relacionado con el requerimiento de estos reguladores para la inducción de *flgJ*, 00347 y 00348. Sin embargo, el que *NolR* reprima a estos genes, pero sea absolutamente necesario para la movilidad en superficie, refleja la complejidad de la regulación de este tipo de movilidad. Probablemente, el efecto inductor de *NolR* se deba a la regulación de otros genes relacionados con este tipo de movilidad. Asimismo, el incremento de movilidad en superficie en ausencia de genisteína exhibido por los mutantes *nodD2* y *syrM* puede estar relacionado con el papel represor de ambos reguladores sobre *flgJ*-00347-00348. Los estudios transcriptómicos del mutante *mucRI* revelaron una sobreexpresión de los genes relacionados con la movilidad, incluso en ausencia de genisteína. Dicha sobreexpresión no se ve reflejada en los experimentos de movilidad en superficie, incluso llegando a mostrar una reducción de la inducción en presencia de genisteína. Este hecho es aún más sorprendente debido a que este mutante aparentemente presenta un incremento en la longitud del flagelo en las condiciones ensayadas (datos de manuscrito en preparación), por lo que esta deficiencia en movilidad podría deberse a un defecto en la funcionalidad del flagelo debido a una estructura anormalmente larga.

Curiosamente, la inactivación de 00347 o 00348, pero no la de *flgJ*, también tiene un cierto impacto en la producción de EPS, aunque ninguno de los mutantes analizados en estos genes parece tener afectados otros polisacáridos superficiales como el KPS o el LPS. En HH103, la producción de EPS está reprimida por flavonoides y *NodD1* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016a). Curiosamente, la inactivación de 00347 conduce a una mayor producción de EPS en ausencia de flavonoides mientras que la de 00348 da lugar a una mayor represión de este polisacárido en presencia de genisteína. Estudios previos de nuestro grupo muestran que la movilidad en superficie en ausencia de flavonoides de HH103 disminuye en un mutante *exoA*, incapaz de producir EPS (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014), y estudios más recientes muestran que dicha disminución es mucho más evidente en presencia de flavonoides (manuscrito en preparación), lo que evidencia un papel importante del EPS en la movilidad en superficie en HH103. El que los mutantes $\Delta 347$ y $\Delta 348$ además de carecer de flagelo o presentar un flagelo no funcional, estén afectados de algún modo en la producción de EPS, podría estar relacionado con su carencia total de movilidad en superficie.

Como en muchas otras bacterias, la formación de biopelículas en *S. fredii* HH103 está directamente relacionada con la producción de EPS (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2014). Las mutaciones en 00347 y 00348 también afectan a la formación de biopelículas, pero no del modo esperado: el mutante $\Delta 347$ produjo más cantidad de *biofilm* que la estirpe silvestre en presencia de genisteína (aunque es en ausencia de este flavonoide cuando se detecta una mayor producción de EPS por parte de este mutante), mientras que en el caso del mutante $\Delta 348$, que produjo menos EPS que HH103 en presencia de genisteína, no se observaron diferencias en la producción de biopelículas. Curiosamente, los dos mutantes en *flgJ* obtenidos en esta Tesis, a pesar de no exhibir cambios en la producción de EPS, presentan una capacidad significativamente superior a la de la estirpe parental para formar biopelículas en ausencia de flavonoides. Aunque este hecho podría explicarse por la falta de movilidad *swimming* de estos mutantes, no es lo que ocurre en los mutantes $\Delta 347$ y $\Delta 348$. Claramente, hacen falta más estudios para clarificar el papel que estos tres genes (*flgJ*, 00347 y 00348) tienen en las características superficiales de la bacteria y en la capacidad de formar biopelículas en superficies inertes. Por otro lado, y dado el papel que estos genes tienen en movilidad y su influencia en la formación de biopelículas, también se ha investigado su posible implicación en la colonización de raíces de soja. Sorprendentemente, sólo el mutante en el gen 00347 parecía estar afectado en dicha capacidad (**Tabla 20**).

Tabla 20. Porcentaje de colonización de las raíces de soja a las 72 horas de inoculación con la estirpe parental y los mutantes *flgJ::lacZ*, $\Delta flgJ$, $\Delta 347$ y $\Delta 348$ ^a.

	HH103 Rif ^R	<i>flgJ::lacZ</i>	$\Delta flgJ$	$\Delta 347$	$\Delta 348$
% de colonización	100%	105%	115%	46%	114%

^a Los datos se obtuvieron de un único ensayo en el caso de los mutantes *flgJ::lacZ* y $\Delta flgJ$ y de tres ensayos en los mutantes $\Delta 347$ y $\Delta 348$.

Los ensayos de nodulación realizados en esta Tesis muestran diferencias en el comportamiento simbiótico de estos mutantes dependiendo de la planta hospedadora con la que se lleve a cabo la interacción. Así, mientras que en los ensayos con *V. unguiculata* el mutante por delección en *flgJ* genera un aumento del peso seco de la parte aérea y la mutación en 00347 incrementa el número de nódulos formados por la planta, en *L. burttii*, el comportamiento de todos los mutantes es indistinguible del de la estirpe silvestre con la excepción del mutante *flgJ::lacZ*, que induce la formación de un número de nódulos y

un peso fresco de la parte aérea significativamente menor en comparación con HH103, aunque como bien se comentó en los resultados, varias de las plantas de *L. burtii* inoculadas con este mutante no crecieron, por lo que esta diferencia entre la estirpe silvestre y la mutante puede deberse a una falta de datos. La diferencia de fenotipos simbióticos entre los dos mutantes en *flgJ* en estas dos leguminosas también podría deberse a un efecto polar del casete *lacZ* Δ p-Gm^R, que puede aumentar la expresión de los genes situados aguas abajo (observación realizada en nuestro laboratorio con otros genes mutados con este casete). Claramente es necesario repetir estos ensayos con ambas plantas para confirmar los resultados, así como realizar estudios de *q*PCR de los genes 00347 y 00348 en ambos fondos mutados en *flgJ*.

Los ensayos de nodulación con *G. max* muestran que, en cuanto al peso seco de la parte aérea de la planta, se aprecian diferencias estadísticamente significativas entre las plantas inoculadas con HH103 y con los mutantes Δ 347, que induce una disminución del desarrollo de la parte aérea y por lo tanto de su peso seco, y Δ *flgJ*, que induce la formación de un mayor número de nódulos y aumenta el peso seco de la parte aérea de las plantas. Del mismo modo, el otro mutante en este gen, *flgJ::lacZ*, también induce la formación de un mayor número de nódulos y con un peso fresco mayor de los mismos, que la estirpe parental. Por tanto, parece que la mutación de *flgJ* afecta positivamente a la simbiosis con soja, sin que en esta interacción simbiótica se observen diferencias notables en el comportamiento de ambos mutantes *flgJ*. El mutante en el gen 00348 aumenta significativamente el número de nódulos formados en *G. max*, sin embargo, el ensayo de reducción de acetileno muestra que estos nódulos son menos eficientes fijando N₂ que los nódulos de HH103, por lo que parece existir una compensación de la baja eficiencia de fijación de nitrógeno con un aumento del número de nódulos. Estos datos sugieren claramente que la inactivación de *flgJ* es beneficiosa para la interacción con soja mientras que la de 00347 o 00348 afecta negativamente a esta simbiosis.

Por último, para detectar si hay interacción entre nuestras proteínas *in vivo*, llevamos a cabo ensayos de doble híbrido en bacteria. Los resultados obtenidos parecen indicar que FlgJ interacciona consigo misma de modo débil, por lo que dos o más copias de esa proteína podrían interactuar *in vivo* en HH103. Sin embargo, los resultados obtenidos acerca de las interacciones entre FlgJ, 347 y 348 indican que estas proteínas no interactúan, al menos de modo estable, entre sí. Estos resultados no son totalmente concluyentes ya que el ensayo de doble híbrido puede presentar tanto falsos positivos como falsos negativos. Además, la técnica empleada es adecuada para la observación de

interacciones fuertes ya que una interacción débil puede dar lugar a un fenotipo fácilmente confundible con el observado en el control negativo. Para poder confirmar estos resultados se podría utilizar BLItz (*Bio-layer interferometry*), una técnica analítica óptica que permite medir interacciones biomoleculares. Esta técnica analiza el patrón de interferencia de la luz blanca reflejada desde dos superficies: una capa de la proteína inmovilizada en la punta del biosensor y otra capa de referencia interna. Cualquier cambio en el número de moléculas unidas a la punta del biosensor provoca un cambio en este patrón de interferencia que se puede medir a tiempo real. Si no hubiera interacción entre proteínas, no se observarían cambios en el patrón de interferencia. Por otro lado, el sistema de doble híbrido se lleva a cabo en *E. coli*, por lo que las interacciones que se analizan son interacciones simples, es decir, no se puede descartar que la interacción entre estas proteínas requiera de otras proteínas accesorias ausentes en *E. coli*, por lo que el sistema de interacción se debería llevar a cabo en un modelo más similar a HH103.

Una cuestión interesante es, ¿por qué un grupo de tres genes relacionados con movilidad está integrado en el regulón *nod* de *S. fredii* HH103? Los datos de RNAseq obtenidos de Pérez-Montaña *et al.* (2016b) muestran claramente que la expresión basal de estos genes es muy baja en ausencia de flavonoides (**Tabla 21**), lo que contrasta con su esencialidad para el movimiento *swimming* que se da tanto en presencia como en ausencia de estas moléculas. El número de lecturas de estos genes se incrementa muy notablemente en presencia de flavonoides, lo que sugiere su importancia en alguna de las etapas durante la simbiosis. Sin embargo, sólo la inactivación de 00347 afecta a la capacidad de colonización, al menos de raíces de soja. La mutación de cualquiera de estos genes tampoco tiene efectos dramáticos, al menos en condiciones controladas de cámara de plantas, en la capacidad simbiótica de HH103 con diversas leguminosas, medida como rendimiento final de la interacción. Claramente, hacen falta más estudios que permitan establecer una funcionalidad más precisa de estos genes y, con ello, su papel en la capacidad simbiótica de HH103.

Tabla 21. Lecturas de los genes *flgJ*, 00347 y 00348 en presencia y ausencia de genisteína.

Lecturas (RNAseq)				
Gen	Sin genisteína	Con genisteína	<i>Fold change</i>	<i>p-adj</i>
SFHH103_00346 (<i>flgJ</i>)	26,51	972,51	7,60	2,45E-07
SFHH103_00347	17,54	370,62	7,00	3,20E-07
SFHH103_00348	41,70	277,21	4,30	2,62E-07

Capítulo IV. Estudio de la red reguladora influenciada por flavonoides de *S. fredii* HH103.

1. Introducción.

En los últimos años, nuestro grupo ha estudiado ampliamente la capacidad simbiótica de *S. fredii* HH103 centrándonos tanto en la implicación de las señales moleculares bacterianas involucradas en este proceso (factores Nod, polisacáridos superficiales, proteínas efectoras secretadas mediante T3SS) como en la regulación de su producción. En *S. fredii* HH103, la proteína NodD1 es el principal regulador de los genes simbióticos bacterianos en presencia de genisteína, un flavonoide inductor, pero hay otros reguladores, como NolR, NodD2, SyrM y TtsI, que desempeñan un papel importante en la regulación de la expresión del regulón *nod* (Vinardell *et al.*, 2004b; 2015; López-Baena *et al.*, 2008). Sin embargo, el papel concreto que juega cada uno de estos reguladores no está totalmente claro.

Durante el proceso simbiótico, el gen *nodD1* se expresa constitutivamente y codifica un activador transcripcional de tipo LysR que, en presencia de flavonoides específicos, reconoce y se une a *nod boxes* (NB), secuencias promotoras localizadas aguas arriba de los genes de nodulación, lo que desencadena su transcripción (Spaink, 2000; Peck *et al.*, 2006). Además de la inducción de la expresión de los genes de nodulación (genes *nod*), *S. fredii* HH103 tiene un T3SS que se induce por genisteína y depende de NodD1 ya que la expresión de *ttsI*, que codifica el regulador transcripcional del T3SS, se regula por una NB (NB18) (López-Baena *et al.*, 2008). La regulación positiva de todos los genes del T3SS está mediada por la proteína TtsI a través de la unión de ésta a secuencias promotoras específicas llamadas *tts boxes* (TB) (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). El gen *syrM* de HH103, localizado en el plásmido simbiótico y cuya expresión también está regulada por una NB (NB19), codifica un regulador transcripcional de tipo LysR cuya expresión se induce por NodD1 y genisteína (Vinardell *et al.*, 2015). En *S. meliloti*, SyrM está involucrado en la regulación de numerosos genes, incluidos algunos de nodulación, directamente a través de su unión a regiones específicas de ADN conocidas como SyrM *boxes* (SB) e indirectamente a través de la inducción/represión de otros reguladores transcripcionales (Barnett *et al.*, 1996). Otro gen regulador importante de HH103 es *nolR* cuya expresión es constitutiva e independiente de flavonoides (Chen *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008). En esta bacteria, la proteína NolR, considerado como un represor global, actúa reprimiendo la expresión de los genes *nod* y la de los genes del T3SS a través de su unión

a regiones conservadas denominadas NoIR *boxes*. Sin embargo, es un regulador positivo de la producción de EPS, aunque se desconoce si lo hace directa o indirectamente (Vinardell *et al.*, 2004a), y en *S. meliloti* es necesario para la modulación fina de la producción de NFs (Kondorosi *et al.*, 1991; Kiss *et al.*, 1998).

En este capítulo analizamos los estudios transcriptómicos realizados recientemente en nuestro laboratorio con la intención de profundizar en el funcionamiento de regulón *nod* de HH103 y poder comprender el papel que desempeña cada regulador en este complejo circuito.

2. Resultados.

2.1. Análisis transcriptómico en los mutantes *nodD2*, *syrM* y *nolR* de los genes diferencialmente expresados de *S. fredii* HH103 en presencia de genisteína.

Para entender mejor el efecto de la genisteína sobre la expresión génica global de *S. fredii* HH103, nuestro grupo ha llevado a cabo estudios transcriptómicos por RNAseq de HH103 y los mutantes en los genes *nodD1* (SVQ318) y *ttsI* (SVQ519) (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b), *nodD2* (SVQ515) y *nolR* (SVQ548) (datos no publicados), y *syrM* (SVQ724) (Acosta-Jurado *et al.*, 2020) en presencia y ausencia de genisteína. Hemos considerados como genes diferencialmente expresados (DEGs, *differentially expressed genes*) aquellos que, en presencia de genisteína, muestran un *fold change* en su expresión menor que -3 o mayor que +3 con respecto a los valores obtenidos para la estirpe silvestre crecida en ausencia de genisteína. Con esta metodología, en la estirpe parental se han identificado 100 DEGs (1,43% del genoma) en presencia de este flavonoide, la mayoría de ellos localizados en el plásmido simbiótico (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). Este grupo de genes lo hemos denominado regulón *nod* de *S. fredii* HH103. La genisteína activa la transcripción de los genes *nod* a través de su interacción con NodD1. Aunque esta proteína interacciona con las NB incluso en ausencia de inductores, la unión del flavonoide adecuado a NodD1 mejora el acceso de la ARN polimerasa y aumenta el nivel de transcripción de los genes de nodulación (Peck *et al.*, 2006). Además, la expresión de *ttsI* también se induce a través de NodD1 y genisteína, de ahí que en ausencia de NodD1 el número de genes que se expresan en presencia de genisteína sea drásticamente menor que los expresados en la estirpe silvestre en presencia de este flavonoide ya que no hay inducción de aquellos genes que están precedidos por una NB o una TB. En el caso del mutante *ttsI*, al estar ausente el regulador transcripcional, no se expresan aquellos genes

controlados por una TB. Esta disminución del número de genes diferencialmente expresados observada en los mutantes *nodD1* y *ttsI* no ocurre en los mutantes en *nodD2*, *nolR* y *syrM* en los que hay 382 (5,45%), 201 (2,88%) y 279 (4,00 %) DEGs en presencia de genisteína por lo que NodD2, NolR y SyrM son reguladores transcripcionales importantes cuya inactivación afecta a la expresión de muchos genes y, en el caso concreto del regulón *nod* de HH103, están implicados en el *fine tuning* de su expresión.

Como hemos mencionado anteriormente, el análisis por RNAseq nos permitió identificar 100 DEGs en *S. fredii* HH103 en presencia de genisteína (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b), que hemos clasificado en cuatro grupos diferentes basándonos en la presencia o ausencia de NB, TB, SB u otra caja en sus secuencias promotoras.

Teniendo en cuenta las NB localizadas en estudios anteriores (Vinardell *et al.*, 2015), los análisis de RNAseq nos han permitido estudiar la funcionalidad de 15 NB presentes en el plásmido simbiótico cuyos genes se inducen con genisteína (>3 fold) en la estirpe silvestre y en el mutante *ttsI*, pero no en el mutante *nodD1*. Solo 11 de ellas promueven la transcripción de los genes situados aguas abajo tras la inducción con genisteína y pueden, por tanto, considerarse funcionales: NB1, NB2, NB8, NB9, NB10, NB13, NB14, NB15, NB17, NB18, NB19 (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b).

Tabla 22. ORFs de *S. fredii* HH103 reguladas por genisteína a través de una NB (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b)^a.

NB ^b	Nombre del gen	(Posibles) Funciones	Fold change ^c
NB1	psfHH103d_373 a 370	Proteínas hipotéticas (Síntesis de hopanoides)	19,3 a 4,1
NB2	psfHH103d_381 a 379 (<i>nodZnoeLnolK</i>)	Fucosilación de LCOs	3,7 a 2,6
NB8	psfHH103d_126 a 132 (<i>nodABCIJnoI'noeI</i>)	Síntesis del esqueleto de LCOs/ Exportación LCO/ Metilación de LCOs	17,7 a 2,4
NB9	psfHH103d_118, 116	Proteínas hipotéticas	10,3, 4,5
NB10	psfHH103d_161	Proteínas hipotéticas (Inhibición de polisacáridos)	21,6
NB13	psfHH103d_448, 447	Proteínas hipotéticas (¿Regulación de la expresión génica?)	27,1, 5,3

NB14	psfHH103d_229 to 224 (<i>fixABCX</i>)	Proteínas hipotéticas/Transferencia de electrones a la nitrogenasa	38,0 a 6,3
NB15	psfHH103d_257 (<i>y4wE</i>)	Biosíntesis del ácido indolacético	24,7
NB17	psfHH103d_208	Proteínas hipotéticas (Transportador de tipo ABC)	17,4
NB18	psfHH103d_323 (<i>ttsI</i>) a 326	Activador transcripcional del T3SS/ Componentes del aparato del T3SS / posible lipoproteína conservada / (Transposasa)	10,1 a 1,5
NB19	psfHH103d_367 (<i>syrM</i>) a 369	Regulador transcripcional / Proteína hipotética (regulador transcripcional)/ Proteína hipotética (reducción de los niveles de etileno)	5,8 a 2,7

^a Genes controlados por una NB que son dependientes de NodD1.

^b De acuerdo con Vinardell *et al.*, 2015.

^c La inducción se ha medido por RNAseq y es con respecto a los cultivos no inducidos. En los operones, el primer y segundo valor corresponde con el primer y último gen de la unidad transcripcional respectivamente.

Los reguladores NodD2, NolR y SyrM afectan de modo diferente a los distintos genes de *S. fredii* HH103 cuya expresión depende de una NB inducible por genisteína y, por tanto, de NodD1. Con respecto a la NB1, los análisis preliminares de RNAseq revelaron que controla la expresión de 5 genes, psfHH103d_373 a psfHH103d_370 (estudiados en el capítulo 2 de esta Tesis), presuntamente relacionados con la síntesis de hopanoides. El análisis de los datos transcriptómicos de estos genes revela un efecto represor tanto de NolR como de NodD2 sobre su expresión (**Tabla 23**), especialmente para los genes psfHH103d_373 y psfHH103d_372, que tienen una inducción 3,85 y 3,12 veces mayor en el mutante *nolR* y 3,27 y 2,66 en el mutante *nodD2* que en HH103. Los genes de HH103 implicados en la síntesis de sus factores Nod se encuentran bajo el control de las NB2 y NB8: todos estos genes están notablemente reprimidos por NolR, NodD2 y SyrM. El efecto de NolR sobre los genes controlados por NB1, NB2 y NB8 puede deberse a la presencia de NolR *boxes* bien conservadas. Por otro lado, nuestros primeros análisis por RNAseq (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b) revelaron que las NB9, NB10, NB13 y NB17 controlan la expresión de genes que codifican proteínas hipotéticas cuyas funciones aún se desconocen. La expresión de estos genes es afectada de modo diferente por mutaciones en *nolR*, *nodD2* o *syrM*. Por ejemplo, la expresión del gen psfHH103d_448 (estudiado en el capítulo 1 de esta Tesis) (NB13) no se afecta por la inactivación de NodD2 o NolR y

disminuye un 40% en ausencia de *SyrM*, mientras que la de *psfHH103d_208* (también estudiado en el capítulo 1) (NB17) se incrementa notablemente en ausencia de *NolR*, en coherencia con la presencia de una *NolR box*, y disminuye levemente en ausencia de *SyrM*. La expresión de *psfHH103d_118* (NB9) es activada por *SyrM* mientras que la de *psfHH103d_161* (NB10) es reprimida levemente por *NolR* y más notablemente por *NodD2*. Los genes dependientes de la NB14 (*psfHH103d_229* a *224*), que podrían estar relacionados con la transferencia de electrones a la nitrogenasa, parecen ser levemente activados por *SyrM* y débilmente reprimidos por *NolR*. En el caso de *psfHH103d_257* (NB15), presuntamente implicado en la síntesis de ácido indol acético, se aprecia un efecto activador de *NodD2* y *SyrM*, y una represión de su expresión por parte de *NolR*. Además, entre los DEGs en los mutantes en los distintos reguladores en presencia de genisteína y comparado con la estirpe parental en presencia del mismo flavonoide, destaca la expresión de dos genes que codifican reguladores transcripcionales, *ttsI* (*psfHH103d_323*, NB18) y *syrM* (*psfHH103d_367*, NB19), que también se inducen por *NodD1* y genisteína. En presencia de genisteína, la expresión de *ttsI* aumenta en mayor o menor medida en los mutantes *nolR*, *nodD2* y *syrM*. En cuanto a *syrM*, se induce ligeramente en el mutante *nolR* y 2,3 veces en el mutante *nodD2* (**Tabla 23**).

Tabla 23. Niveles de expresión de DEGs regulados por NB en *S. fredii* HH103 y sus derivados *nolR*, *nodD2* y *syrM* en presencia de genisteína ^a.

Nombre del gen	NB	NoIR <i>box</i> ^b	SyrM <i>box</i> ^b	Fold change en HH103 + genisteína ^c	Fold change en el mutante <i>nolR</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	Fold change en el mutante <i>nodD2</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	Fold change en el mutante <i>syrM</i> + genisteína ^d /Ratio ^e
psfHH103d_373	1	+	-	19,30	74,25/3,85	63,14/3,27	22,13/1,15
psfHH103d_372	1			18,33	57,18/3,12	48,70/2,66	15,62/0,85
psfHH103d_371_5	1			4,97	8,59/1,73	9,04/1,82	4,00/0,80
psfHH103d_371	1			2,99	5,04/1,68	6,52/2,18	3,02/1,01
psfHH103d_370	1			4,13	5,45/1,32	8,90/2,15	4,83/1,17
psfHH103d_381/ <i>nodZ</i>	2	+	-	3,46	10,43/3,02	10,64/3,08	6,01/1,74
psfHH103d_380/ <i>noeI</i>	2			3,74	15,55/4,16	19,49/5,22	10,61/2,84
psfHH103d_379/ <i>nolK</i>	2			2,65	9,68/3,65	11,46/4,32	6,92/2,61
psfHH103d_126/ <i>nodA</i>	8	+	-	17,65	102,56/5,81	233,98/13,25	77,22/4,37
psfHH103d_127/ <i>nodB</i>	8			11,12	72,63/6,53	117,93/10,60	41,26/3,71
psfHH103d_128/ <i>nodC</i>	8			3,61	19,89/5,51	40,94/11,35	16,52/4,58
psfHH103d_129/ <i>nodI</i>	8			4,02	26,26/6,53	73,73/18,32	27,62/6,86
psfHH103d_130/ <i>nodJ</i>	8			2,87	11,47/3,99	30,43/10,59	13,01/4,53
psfHH103d_131/ <i>nolO</i>	8			2,60	6,57/2,53	20,35/7,83	8,97/3,45
psfHH103d_132/ <i>noeI</i>	8			2,39	9,34/3,90	39,89/16,66	15,20/6,35
psfHH103d_118	9			-	-	10,32	11,49/1,11
psfHH103d_116	9	4,49	7,28/1,62			5,24/1,17	3,30/0,74
psfHH103d_161	10	-	-	21,58	35,58/1,65	45,84/2,12	19,78/0,92
psfHH103d_448	13	-	-	27,06	29,93/1,11	29,04/1,07	16,50/0,61
psfHH103d_447	13			5,30	7,31/1,38	6,84/1,29	ND ^f
psfHH103d_229	14	+	-	37,99	52,17/1,37	49,27/1,30	22,61/0,60

psfHH103d_228	14			29,33	37,91/1,29	18,45/0,63	9,31/0,32
psfHH103d_227/fixA	14			8,92	12,14/1,36	8,74/0,98	4,37/0,49
psfHH103d_226/fixB	14			6,75	13,38/1,98	5,35/0,79	2,93/0,43
psfHH103d_225/fixC	14			7,81	20,17/2,58	14,86/1,90	8,26/1,06
psfHH103d_224/fixX	14			6,30	12,46/1,98	11,57/1,84	6,79/1,08
psfHH103d_257/y4wE	15	+	-	24,70	56,03/2,27	9,70/0,39	5,25/0,21
psfHH103d_208	17	+	-	17,43	59,30/3,40	14,98/0,86	11,54/0,66
psfHH103d_323/ttsI	18	+	-	10,10	26,68/2,64	51,79/5,13	17,76/1,76
psfHH103d_324/rhcC2	18			3,80	6,04/1,59	21,93/5,77	8,66/2,28
psfHH103d_325	18			2,17	3,67/1,69	20,37/9,40	7,71/3,56
psfHH103d_326	18			1,49	1,82/1,22	2,12/1,42	1,28/0,86
psfHH103d_367/syrM	19	-	-	5,81	8,23/1,42	13,36/2,30	ND
psfHH103d_368	19			2,66	3,81/1,43	2,41/0,91	2,00/0,75
psfHH103d_369	19			3,28	3,90/1,19	3,31/1,01	2,72/0,83

^a Todos estos genes pierden esta inducción en un fondo NodD1.

^b Presencia de una *NolR box* o *SyrM box* bien conservada aguas arriba del gen/operón.

^c Valores de *fold change* para la estirpe silvestre (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b).

^d Con respecto a HH103 crecida en ausencia de genisteína.

^e Ratio d/c:

Cuando las comparaciones se hacen entre la estirpe mutante y la estirpe silvestre, ambas crecidas en presencia de genisteína:

En rojo: genes que se inducen en el mutante (ratio>3).

En rojo claro: genes que se inducen ligeramente en el mutante (2<ratio<3).

En azul claro: genes cuya inducción se reduce ligeramente en el mutante (0.33<ratio<0.5).

En azul: genes cuya inducción se reduce notablemente en el mutante (ratio<0.33).

^f ND, no determinado.

S. fredii HH103 tiene un T3SS inducible por genisteína y dependiente de NodD1 ya que la expresión de *ttsI*, el regulador transcripcional del T3SS, depende de una NB funcional (López-Baena *et al.*, 2008). A su vez, TtsI activa la expresión de los genes de este sistema de secreción uniéndose a TB. En HH103 se han encontrado 18 posibles TB distribuidas entre varios replicones (Vinardell *et al.*, 2015). Sin embargo, nuestros estudios de RNAseq muestran que sólo 11 (TB1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 y 13) parecen ser funcionales ya que se localizan aguas arriba de genes transcripcionalmente activos en la estirpe silvestre en presencia de genisteína, pero no en los mutantes en *nodD1* y *ttsI* (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b).

Tabla 24. ORFs de *S. fredii* HH103 reguladas por genisteína a través de una TB (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b) ^{a, b}.

TB ^c	Nombre del gen	(Posibles) Funciones	Fold change ^d
TB1	SFHH103_04201 (<i>nopM2</i>)	Ubiquitinización E3	2,1
TB2	SFHH103_04163 (<i>nopI</i>) a 04167	Efector putativo/ Proteínas hipotéticas	3,7 a 3,1
TB3	psfHH103d_90 (<i>nopM</i>)	Ubiquitinización E3	2,2
TB4	psfHH103d_287 (<i>nopD</i>)	Actividad peptidasa C48	7,7
TB5	psfHH103d_292 (<i>gunA</i>), 293	Actividad celulasa / Proteína hipotética	5,2, 6,5
TB8	psfHH103_335 (<i>nopX</i>) a 329	Efectores de translocación del T3SS/ Proteínas hipotéticas	10,3 a 3,3
TB9	psfHH103d_327 (<i>nopL</i>)	MAPK, <i>Mitogen-activated protein kinase</i>	4,6
TB10	psfHH103d_337 a 348 (<i>nopBrhcJnolUrhcLNQRSTU</i>)	Componentes del aparato del T3SS	25,3 a 4,2
TB11	psfHH103d_349 (<i>nopP</i>)	MAPK	5,5
TB12	psfHH103d_3504, 3506, 351 a 353 (<i>nopCAy4yPrhcVy4yS</i>)	Proteína efectora/Componente del aparato del T3SS/Componente del aparato del T3SS	7,2 a 4,8
TB13	psfHH103d_363 (<i>nopT</i>)	Actividad peptidasa C46	4,5

^a Genes controlados por una TB que son dependientes de NodD1 y TtsI.

^b Con la excepción de los genes precedidos por la TB1 y TB2, todos los demás genes se localizan en el plásmido simbiótico (pl. d, pSFHH103d).

^c De acuerdo con Vinardell *et al.*, 2015.

^d La inducción es con respecto a los cultivos no inducidos. En los operones, el primer y segundo valor corresponde con el primer y último gen de la unidad transcripcional respectivamente.

Las TB5, 8, 10 y 12 controlan la expresión de operones que codifican proteínas que: i) son componentes estructurales del aparato del T3SS (como *nopBrhcInolUrhcLNQRSTU* y *nopCAy4yQ*), ii) están implicadas en la translocación de proteínas al citoplasma de la célula de la raíz (el operón *psfHH103_335* a *329*), o iii) codifican para enzimas glicolíticas (*gunA*). El resto de TB (TB1, 2, 3, 4, 9, 11 y 13) controlan la expresión de genes que codifican las proteínas efectoras NopI, NopM/M2, NopD, NopL, NopP y NopT (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). En general, la mayoría de estos genes que están precedidos por una TB, presentan además una *NoIR box* por lo que su expresión aumenta significativamente en el mutante *nolR* en comparación con HH103 en presencia de genisteína. No obstante, en el mutante *nodD2* existe una “selección” de algunos grupos génicos (*gunA*, *nopC*, *nopP* y *nopX*) cuya inducción también es significativa. En cambio, SyrM no parece ejercer una regulación notable sobre el T3SS, ya que sólo presenta una ligera inducción en algunos de los genes relacionados con este sistema en ausencia de este regulador. Curiosamente, *psfHH103d_293* (TB5), el gen que sigue a *gunA*, es el único gen precedido por una TB que se reprime por la ausencia de SyrM (**Tabla 25**). Finalmente hemos incorporado a la **Tabla 25** los genes *flgJ-00347-00348* porque, aunque originalmente se habían incluido en los genes del regulón *nod* carentes de NB y TB (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b), los estudios realizados en el capítulo 3 de esta Tesis muestran que su expresión depende de una TB que, aunque difiere de la secuencia consenso, es funcional. Tal como vimos en el capítulo 3, los datos de RNAseq muestran un papel represor de NodD2, SyrM y NoIR sobre estos tres genes.

Tabla 25. Niveles de expresión de DEG en diferentes estirpes de *S. fredii* HH103 dependientes de genisteína y TB^a.

Nombre del gen	TB	NolR <i>box</i> ^b	SyrM <i>box</i> ^b	Fold change en HH103 + genisteína ^c	Fold change en el mutante <i>nolR</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	Fold change en el mutante <i>nodD2</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	Fold change en el mutante <i>syrM</i> + genisteína ^d /Ratio ^e
SFHH103_04201/ <i>nopM2</i>	1	-	-	2,10	5,22/2,49	3,79/1,80	2,68/1,28
SFHH103_04163/ <i>nopI</i>	2	+	-	3,13	6,74/2,15	2,71/0,87	1,74/0,56
SFHH103_04165	2			3,79	10,25/2,71	4,88/1,29	3,01/0,80
SFHH103_04166	2			3,72	4,57/1,23	5,01/1,35	3,00/0,81
SFHH103_04167	2			3,68	3,27/0,89	5,29/1,44	3,17/0,86
psfHH103d_90/ <i>nopM</i>	3	-	-	2,23	5,79/2,60	4,05/1,82	2,91/1,31
psfHH103d_287/ <i>nopD</i>	4	+	-	7,72	45,73/5,92	48,17/6,24	16,22/2,10
psfHH103d_292/ <i>gunA</i>	5	+	-	5,21	24,55/4,71	20,15/3,87	8,60/1,65
psfHH103d_293	5			6,53	28,84/4,42	3,69/0,56	1,14/0,17
psfHH103d_335/ <i>nopX</i>	8	+	-	9,72	82,03/8,44	61,25/6,30	24,68/2,54
psfHH103d_333 (<i>y4yB</i>)	8			10,34	66,16/6,40	36,08/3,49	16,69/1,61
psfHH103d_332 (<i>y4yA</i>)	8			7,95	56,59/7,12	57,39/7,22	22,18/2,79
psfHH103d_331	8			3,96	25,92/6,55	19,53/4,93	8,72/2,20
psfHH103d_330 (<i>y4xP</i>)	8			4,06	14,26/3,51	12,22/3,01	5,92/1,46
psfHH103d_329 (<i>y4xO</i>)	8			3,34	10,91/3,27	10,08/3,02	4,70/1,41
psfHH103d_327/ <i>nopL</i>	9	+	-	4,56	17,57/3,85	4,91/1,08	3,88/0,85
psfHH103d_337/ <i>nopB</i>	10	-	-	21,88	76,51/3,50	69,38/3,17	31,99/1,46
psfHH103d_338/ <i>rhcJ</i>	10			25,34	63,28/2,50	45,14/1,78	22,83/0,90
psfHH103d_339/ <i>nolU</i>	10			20,07	55,07/2,74	27,31/1,36	14,65/0,73
psfHH103d_340/ <i>rhcL</i>	10			12,53	37,50/2,99	26,55/2,12	13,32/1,06
psfHH103d_341/ <i>rhcN</i>	10			17,33	40,79/2,35	44,03/2,54	19,26/1,11
psfHH103d_342	10			11,95	27,98/2,34	20,85/1,75	12,34/1,03
psfHH103d_343/ <i>rhcQ</i>	10			13,06	32,99/2,53	33,17/2,54	14,70/1,12

psfHH103d_344/ <i>rhcR</i>	10			8,91	26,57/2,98	24,03/2,70	12,75/1,43
psfHH103d_345/ <i>rhcS</i>	10			8,83	22,08/2,50	32,78/3,71	11,11/1,26
psfHH103d_346/ <i>rhcT</i>	10			6,56	18,43/2,81	20,01/3,05	10,83/1,65
psfHH103d_347/ <i>rhcU</i>	10			4,83	11,16/2,31	17,59/3,64	9,11/1,89
psfHH103d_348	10			4,16	6,71/1,61	12,88/3,09	5,06/1,21
psfHH103d_349/ <i>nopP</i>	11	+	-	5,48	31,50/5,74	28,13/5,13	10,89/1,99
psfHH103d_3504/ <i>nopC</i>	12			6,29	18,11/2,88	14,80/2,35	17,99/2,86
psfHH103d_3506/ <i>nopA</i>	12			4,85	11,65/2,40	5,42/1,12	4,19/0,86
psfHH103d_351	12	+	-	7,22	18,38/2,54	13,43/1,86	7,44/1,03
psfHH103d_352/ <i>rhcV</i>	12			4,77	14,74/3,09	6,93/1,45	3,90/0,82
psfHH103d_353/ <i>y4yS</i>	12			5,62	17,99/3,20	11,50/2,04	7,24/1,29
psfHH103d_363/ <i>nopT</i>	13	-	-	4,48	10,21/2,28	4,95/1,10	3,09/0,69
SFHH103_00346/ <i>flgJ</i>	-			7,57	59,59/7,88	59,77/7,90	20,22/2,67
SFHH103_00347	-	-	-	6,98	39,74/5,69	43,85/6,28	15,23/2,18
SFHH103_00348	-			4,34	15,49/3,57	14,84/3,42	5,64/1,30

^a Todos estos genes pierden esta inducción en un fondo NodD1.

^b Presencia de una *NolR box* o *SyrM box* bien conservada aguas arriba del gen/operón.

^c Valores de *fold change* para la estirpe silvestre (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b).

^d Con respecto a HH103 crecida en ausencia de genisteína.

^e Ratio d/c:

Cuando las comparaciones se hacen entre la estirpe mutante y la estirpe silvestre, ambas crecidas en presencia de genisteína:

En rojo: genes que se inducen en el mutante (ratio>3).

En rojo claro: genes que se inducen ligeramente en el mutante (2<ratio<3).

En azul: genes cuya inducción se reprime en el mutante (0.33<ratio).

En azul claro: genes cuya inducción se reduce ligeramente en el mutante (0.33<ratio<0.5).

Además de NodD1 y TtsI, otras proteínas participan en la regulación de los genes simbióticos bacterianos, entre ellas SyrM. En las especies de *Sinorhizobium*, SyrM está involucrada en la regulación de ciertos genes simbióticos a través de su unión a unas regiones promotoras conocidas como SyrM *boxes* (Barnett *et al.*, 1996). *S. fredii* HH103 presenta una copia de *syrM* (psfHH103d_367) y está precedido por la NB19. Por ello, SyrM es un perfecto candidato para ser el activador transcripcional de algunos genes de HH103 que se inducen por genisteína y NodD1 pero que no están controlados directamente por una NB o TB (Acosta-Jurado *et al.*, 2020). Sin embargo, sólo hemos encontrado SB bien conservadas aguas arriba de dos operones: psfHH103d_306 a psfHH103d_311 (codifican proteínas hipotéticas que podrían estar involucradas en la transferencia de electrones a la nitrogenasa) y psfHH103d_322 a psfHH103d_319 (codifican proteínas hipotéticas y la proteína reguladora NodD2). Estos dos grupos de genes muestran una alta dependencia de SyrM para expresarse, y están claramente reprimidos en el mutante Δ *syrM* en presencia de genisteína (**Tabla 26**; Acosta-Jurado *et al.*, 2020).

Tabla 26. Niveles de expresión de DEG en diferentes estirpes de *S. fredii* HH103 dependientes de genisteína y SB^a.

Nombre del gen	NoIR <i>box</i> ^b	<i>Fold change</i> en HH103 + genisteína ^c	<i>Fold change</i> en el mutante <i>nodD1</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	<i>Fold change</i> en el mutante <i>ttsI</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	<i>Fold change</i> en el mutante <i>noIR</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	<i>Fold change</i> en el mutante <i>nodD2</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	<i>Fold change</i> en el mutante <i>syrM</i> + genisteína ^d /Ratio ^e
<i>pSfHH103d</i>							
psfHH103d_306	-	20,53	1,21/0,06	23,27/1,13	19,60/0,95	25,42/1,24	0,92/0,04
psfHH103d_307		21,10	1,10/0,05	23,62/1,12	19,87/0,94	22,39/1,06	0,91/0,04
psfHH103d_308		20,13	0,91/0,05	21,19/1,05	18,06/0,90	43,38/2,15	1,70/0,08
psfHH103d_310		16,57	0,77/0,05	14,56/0,88	14,41/0,87	29,37/1,77	2,41/0,15
psfHH103d_311		11,73	0,59/0,05	11,27/0,96	9,43/0,80	14,73/1,26	1,56/0,13
psfHH103d_319	-	3,22	1,00/0,31	2,10/0,65	2,18/0,68	2,48/0,77	1,70/0,53
psfHH103d_320/ <i>nodD2</i>		6,60	0,83/0,13	6,95/1,05	4,38/0,66	ND ^f	2,56/0,39
psfHH103d_322		27,20	0,38/0,01	30,40/1,12	21,04/0,77	66,15/2,43	2,76/0,10

^a Todos estos genes pierden esta inducción en un fondo NodD1.

^b Presencia de una NoIR *box* bien conservada aguas arriba del gen/operón.

^c Valores de *fold change* para la estirpe silvestre (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b).

^d Con respecto a HH103 crecida en ausencia de genisteína.

^e Ratio d/c:

Cuando las comparaciones se hacen entre la estirpe mutante y la estirpe silvestre, ambas crecidas en presencia de genisteína:

En rojo claro: genes que se inducen ligeramente en el mutante ($2 < \text{ratio} < 3$).

En azul: genes cuya inducción se reprime en el mutante ($0.33 < \text{ratio}$).

En azul claro: genes cuya inducción se reduce ligeramente en el mutante ($0.33 < \text{ratio} < 0.5$).

^f ND, no determinado.

Dentro del regulón *nod* de HH103 también se han encontrado genes que se inducen por NodD1 y genisteína y que no están controlados por una NB, TB, SB o *NolR box*, lo que indica que existen reguladores que median en la cascada flavonoide-NodD1 que aún no han sido estudiados. Todos estos genes presentan una expresión diferente en función del regulador transcripcional mutado como fondo genético y comparado con la estirpe parental en las mismas condiciones (**Tabla 27**). Para los tres reguladores estudiados (*NolR*, *NodD2* y *SyrM*) es posible encontrar tanto papel activador como represor según el gen en cuestión. Por ejemplo, *psfHH103d_275* y *psfHH103d_274*, dos genes localizados en el plásmido simbiótico, están claramente inducidos en los mutantes *nolR* y *nodD2* y levemente reprimidos en el mutante *ttsI* en presencia de genisteína. Otro ejemplo es *ligE* (SFHH103_00841), que codifica una enzima como un dominio GstA (glutatión S-transferasa) probablemente implicado en procesos de detoxificación, y cuya expresión se reduce significativamente en los mutantes *nodD2* y *syrM* en comparación con HH103 en presencia de genisteína.

Finalmente, existen 6 genes del regulón *nod* de HH103 cuya expresión se afecta notablemente por genisteína incluso en ausencia de los reguladores NodD1 y/o *TtsI* (**Tabla 28**). Tres de estos genes se localizan separados en el cromosoma y se inducen en presencia de genisteína. Codifican una proteína de resistencia a tóxicos (SFHH103_03274), un regulador transcripcional de la familia TetR (SFHH103_03749) y una posible permeasa (SFHH103_03875). SFHH103_03274 ve reducida levemente su inducción en ausencia de NodD2 o *SyrM* mientras que la de SFHH103_03749 se reduce en ausencia de *TtsI* y de *NolR* y aumenta cuando faltan NodD2 o *SyrM*. La expresión de SFHH103_03875 no se ve alterada por la ausencia de ninguno de estos tres reguladores. Los otros tres genes cuya expresión se influencia por genisteína independientemente de NodD1 se localizan agrupados en el plásmido pSfHH103e y se reprimen en presencia de este flavonoide. Este conjunto génico consta de otro regulador transcripcional de la familia TetR (SFHH103_05321) y dos de los tres componentes de una bomba de expulsión de tóxicos (SFHH103_05320 y SFHH103_05319). El regulador TetR reprime su propia expresión y la de SFHH103_05320 y SFHH103_05319 en presencia de genisteína (Almozara-García, 2019). La expresión de los tres genes se reduce aún más en un mutante *nolR*. Curiosamente, aguas arriba de SFHH103_05321 existe una *NolR box*.

Tabla 27. Niveles de expresión de DEG en diferentes estirpes de *S. fredii* HH103 dependientes de genisteína y que carecen de NB, TB o SB^a.

Nombre del gen	NoIR <i>box</i> ^b	Fold change en HH103 + genisteína ^c	Fold change en el mutante <i>nodD1</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	Fold change en el mutante <i>ttsI</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	Fold change en el mutante <i>noIR</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	Fold change en el mutante <i>nodD2</i> + genisteína ^d /Ratio ^e	Fold change en el mutante <i>syRM</i> + genisteína ^d /Ratio ^e
<i>Cromosoma</i>							
SFHH103_00450	-	0,28	0,67/2,39	0,33/1,18	0,26/0,92	0,72/2,48	0,57/2,02
SFHH103_00451		0,15	0,45/3,00	0,20/1,33	0,10/0,68	0,23/1,53	0,19/1,25
SFHH103_00799	-	0,30	0,71/2,37	0,40/1,33	0,24/0,80	0,50/1,67	0,37/1,22
SFHH103_00841/ <i>ligE</i>	-	7,77	0,67/0,09	8,36/1,08	8,64/1,11	1,50/0,19	1,08/0,14
SFHH103_00844	-	3,23	1,70/0,53	1,00/0,31	1,68/0,52	25,97/8,03	15,98/4,94
SFHH103_01317	-	0,31	1,10/3,55	1,20/3,87	0,31/1,00	0,76/2,44	1,41/4,51
SFHH103_01920	-	4,59	0,68/0,15	1,50/0,33	4,89/1,07	1,94/0,42	1,63/0,36
SFHH103_02192	-	6,90	0,61/0,09	11,64/1,69	11,33/1,64	21,36/3,10	10,55/1,53
SFHH103_02323/ <i>hmuU</i>	-	0,30	1,20/4,00	1,30/4,33	0,40/1,31	0,98/3,27	0,79/2,58
<i>pSfHH103e</i>							
SFHH103_06013/ <i>pdh</i>	-	3,58	1,20/0,34	2,40/0,67	2,15/0,60	4,15/1,16	2,88/0,81
<i>pSfHH103d</i>							
psfHH103d_255	-	3,39	1,10/0,32	3,00/0,88	5,93/1,75	6,33/1,86	2,78/0,82
psfHH103d_275	-	3,45	0,69/0,20	1,42/0,41	14,43/4,18	16,70/4,84	5,94/1,72
psfHH103d_274	-	3,36	0,91/0,27	1,20/0,36	10,73/3,20	8,17/2,43	2,60/0,77

^a Todos estos genes pierden esta inducción en un fondo NodD1.

^b Presencia de una NoIR *box* bien conservada aguas arriba del gen/operón.

^c Valores de *fold change* para la estirpe silvestre (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b).

^d Con respecto a HH103 crecida en ausencia de genisteína.

^e Ratio d/c:

Quando las comparaciones se hacen entre la estirpe mutante y la estirpe silvestre, ambas crecidas en presencia de genisteína:

En rojo: genes que se inducen en el mutante (ratio>3).

En rojo claro: genes que se inducen ligeramente en el mutante (2<ratio<3).

En azul: genes cuya inducción se reprime en el mutante (0.33<ratio).

En azul claro: genes cuya inducción se reduce ligeramente en el mutante ($0.33 < \text{ratio} < 0.5$).

Tabla 28. DEGs en diferentes estirpes de *S. fredii* HH103 cuyos niveles de expresión se afecta notablemente por genisteína incluso en ausencia de los reguladores NodD1 y/o TtsI.

Nombre del gen	NoIR <i>box</i> ^a	Fold change en HH103 + genisteína ^b	Fold change en el mutante <i>nodD1</i> + genisteína ^c /Ratio ^d	Fold change en el mutante <i>ttsI</i> + genisteína ^c /Ratio ^d	Fold change en el mutante <i>nolR</i> + genisteína ^c /Ratio ^d	Fold change en el mutante <i>nodD2</i> + genisteína ^c /Ratio ^d	Fold change en el mutante <i>syrM</i> + genisteína ^c /Ratio ^d
<i>Cromosoma</i>							
SFHH103_03274	-	3,01	2,40/0,80	2,70/0,90	3,57/1,19	1,99/0,66	1,61/0,53
SFHH103_03749	-	3,88	3,50/0,90	1,50/0,39	1,61/0,42	11,29/2,91	11,71/3,01
SFHH103_03875	-	6,03	7,30/1,21	5,60/0,93	6,48/1,07	6,29/1,04	5,95/0,99
<i>pSfHH103e</i>	-						
SFHH103_05319	+	0,29	0,16/0,56	0,23/0,80	0,16/0,55	0,29/1,00	0,32/1,10
SFHH103_05320		0,20	0,13/0,63	0,20/0,96	0,09/0,50	0,13/0,65	0,16/0,78
SFHH103_05321		0,18	0,13/0,71	0,17/0,98	0,08/0,44	0,14/0,77	0,18/1,03

^a Presencia de una NoIR *box* bien conservada aguas arriba del gen/operón.

^b Valores de *fold change* para la estirpe silvestre (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b).

^c Con respecto a HH103 crecida en ausencia de genisteína.

^d Ratio c/b:

Cuando las comparaciones se hacen entre la estirpe mutante y la estirpe silvestre, ambas crecidas en presencia de genisteína:

En rojo: genes que se inducen en el mutante (ratio>3).

En rojo claro: genes que se inducen ligeramente en el mutante ($2 < \text{ratio} < 3$).

En azul claro: genes cuya inducción se reduce ligeramente en el mutante ($0.33 < \text{ratio} < 0.5$).

La expresión de algunos estos genes inducibles por genisteína en los mutantes *nodD1*, *ttsI*, *nodD2*, *nolR* y *syrM* (Tabla 23, 25, 26, 27 y 28) se ha validado por ensayos de *qPCR*, que confirman los datos obtenidos por *RNAseq* (Tabla 29).

Tabla 29. Validación de los datos de RNAseq usando qRT-PCR (qPCR)^a.

ID del gen/Secuencias promotoras	Nombre del gen	RNAseq						qPCR					
		Silvestre	<i>nodD1</i>	<i>ttsI</i>	<i>nodD2</i>	<i>nolR</i>	<i>syrM</i>	Silvestre	<i>nodD1</i>	<i>ttsI</i>	<i>nodD2</i>	<i>nolR</i>	<i>syrM</i>
psfHH103d_373/NB1	-	19,30	1,58	32,44	3,27	3,85	22,12	15,45	2,30	100,19	2,33	3,49	ND
psfHH103d_126/NB8	<i>nodA</i>	17,65	0,63	14,68	13,22	5,79	77,22	30,31	1,49	20,42	11,19	19,24	104,69
psfHH103d_161/NB10	-	21,58	0,79	22,37	2,12	1,65	19,78	15,85	2,34	33,05	3,94	3,59	ND
psfHH103d_448/NB13	-	27,06	0,87	28,73	1,07	1,10	16,50	171,06	2,48	144,34	0,53	2,83	ND
psfHH103d_229/NB14	-	37,99	0,83	23,89	1,30	1,37	22,61	39,26	1,59	89,26	1,06	5,34	14,57
psfHH103d_257/NB15	<i>y4wE</i>	24,69	0,77	31,5	0,39	2,27	5,24	63,79	1,37	118,87	0,30	4,77	5,10
psfHH103d_208/NB17	-	17,43	0,76	39,14	0,86	3,41	11,54	25,93	1,81	86,62	0,57	5,97	ND
psfHH103d_367/NB19	<i>syrM</i>	5,81	0,58	9,29	2,30	1,42	ND	6,51	1,71	8,47	1,26	0,55	ND
SFHH103_04163/TB2	<i>nopI</i>	3,13	0,82	1,82	0,87	2,16	1,74	24,82	2,39	2,06	5,70	3,88	ND
psfHH103d_292/TB5	<i>gunA</i>	5,21	0,85	2,11	3,88	4,71	8,60	5,49	2,06	1,64	8,22	9,36	ND
psfHH103d_327/TB9	<i>nopL</i>	4,56	0,35	2,31	1,07	3,80	3,88	43,01	1,90	1,54	4,78	3,01	ND
psfHH103d_3504/TB12	<i>nopC</i>	6,29	0,40	1,63	2,35	2,87	17,99	22,52	2,14	2,33	5,27	4,89	ND
SFHH103_00346/TB	<i>flgJ</i>	7,57	0,77	2,07	7,86	7,84	20,22	5,65	0,66	0,42	8,64	5,76	ND
psfHH103d_255/-	-	3,39	0,88	3,00	1,86	1,74	2,78	3,65	1,20	9,51	0,67	1,10	ND
psfHH103d_275/-	-	3,45	0,69	1,42	4,91	4,24	5,94	1,51	0,83	0,53	18,92	8,38	ND
psfHH103d_306/SB1	-	20,53	1,21	23,27	1,24	0,96	0,92	103,01	1,30	165,04	1,39	1,51	1,09
SFHH103_02192/-	-	6,90	0,61	11,64	3,10	1,64	10,55	68,04	0,81	19,20	ND	ND	ND
SFHH103_05321/-	-	0,18	0,24	0,17	0,77	0,44	0,18	0,14	0,15	0,10	ND	ND	ND
SFHH103_00387	<i>fbpA</i>	1,03	0,29	0,11	0,02	0,06	0,02	1,07	0,03	0,03	ND	ND	ND

^a ND, no determinado por qPCR.

2.2. Análisis transcriptómico de los principales genes reguladores del regulon *nod* en presencia de genisteína y validación de los datos obtenidos por RNAseq mediante experimentos de qPCR.

Con objeto de estudiar las relaciones entre los distintos genes reguladores del regulón *nod*, se analizaron los datos transcriptómicos obtenidos en ausencia y presencia de genisteína en la estirpe parental y en los mutantes individuales en cada gen regulador (*nodD1*, *ttsI*, *syrM*, *nodD2* y *nolR*), centrándonos en el efecto que produce la inactivación de cada uno de estos reguladores en la expresión del resto de ellos (**Tabla 30**).

En ausencia de genisteína no observamos expresión diferencial de estos genes en ninguno de los fondos mutantes estudiados en comparación con HH103 en la misma condición. En presencia de genisteína, la inactivación de NodD1 influye negativamente la expresión de los genes *ttsI*, *syrM* y *nodD2* ($0.33 < \text{ratio}$), mientras que la expresión de *nolR* no se ve afectada. Sólo el gen *ttsI* se sobreexpresa ligeramente en presencia de genisteína en el mutante *nolR* en comparación con la estirpe silvestre en esta misma condición, mientras que la expresión de *nodD2* se reduce ligeramente. También observamos que en el mutante *nodD2*, los genes *ttsI* y *syrM* muestran una expresión diferencial positiva en presencia de genisteína, menos acusada en el caso de *syrM*. En el mutante *syrM*, los genes *nodD2* y *nolR* se encuentran reprimidos en presencia de genisteína. Por último, la inactivación de *ttsI* tuvo un leve efecto inductor sobre *syrM* (**Tabla 30**).

Tabla 30. Niveles de expresión (RNAseq) de *nodD1*, *ttsI*, *nolR*, *nodD2* y *syrM* en la estirpe silvestre y en los distintos fondos mutantes en genes reguladores en presencia y ausencia de genisteína comparado con la estirpe silvestre en ausencia de este flavonoide.

Nombre del gen	Fold change										
	WT ^a	Mutante <i>nodD1</i>		Mutante <i>ttsI</i>		Mutante <i>nolR</i>		Mutante <i>nodD2</i>		Mutante <i>syrM</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
psfHH103d_386/ <i>nodD1</i>	0,80	ND ^b	ND	0,97	0,76	0,81	0,96	0,79	1,36	1,18	0,85
psfHH103d_323/ <i>ttsI</i>	10,10	0,89	0,82	ND	ND	1,39	26,68	0,91	51,79	1,16	17,76
SFHH103_02239/ <i>nolR</i>	0,99	1,35	0,93	0,93	1,20	ND	ND	0,58	0,54	0,69	0,32
psfHH103d_320/ <i>nodD2</i>	6,60	1,49	0,92	1,29	6,94	1,05	4,38	ND	ND	1,22	2,56
psfHH103d_367/ <i>syrM</i>	5,81	1,41	0,86	1,13	9,30	1,57	8,23	1,06	13,36	ND	ND
Nombre del gen	Ratio ^c										
	WT	Mutante <i>nodD1</i>		Mutante <i>ttsI</i>		Mutante <i>nolR</i>		Mutante <i>nodD2</i>		Mutante <i>syrM</i>	
	+	+		+		+		+		+	
psfHH103d_386/ <i>nodD1</i>	-	ND		0,95		1,20		1,70		1,06	
psfHH103d_323/ <i>ttsI</i>	-	0,08		ND		2,64		5,13		1,76	
SFHH103_02239/ <i>nolR</i>	-	0,94		1,21		ND		0,54		0,32	
psfHH103d_320/ <i>nodD2</i>	-	0,14		1,05		0,66		ND		0,39	
psfHH103d_367/ <i>syrM</i>	-	0,15		1,60		1,42		2,30		ND	

^a Valores de *fold change* para la estirpe silvestre (Pérez-Montañó *et al.*, 2016b).

^b ND, no determinado.

^c Ratio entre el valor de *fold change* de cada mutante y el obtenido en la estirpe silvestre, ambos en presencia de genisteína:

Cuando las comparaciones se hacen entre la estirpe mutante en presencia de genisteína y la estirpe silvestre en presencia y ausencia de genisteína:

En rojo: genes que se inducen en el mutante (ratio>3).

En rojo claro: genes que se inducen ligeramente en el mutante (2<ratio<3).

En azul: genes cuya inducción se reprime en el mutante (0.33<ratio).

En azul claro: genes cuya inducción se reduce ligeramente en el mutante (0.33<ratio<0.5).

Para validar la expresión de los genes *nodD1*, *ttsI*, *nolR*, *nodD2* y *syrM* en los distintos fondos mutantes se realizaron experimentos de *qPCR* con cultivos en fase estacionaria temprana de *S. fredii* HH103 y de los mutantes *nodD1*, *ttsI*, *nodD2*, *nolR* y *syrM* crecidos en presencia de genisteína (**Tabla 31**). Como gen control se incluyó *nodA*, que se induce mediante NodD1 y flavonoides y se reprime por NolR, NodD2 y SyrM. En general, los experimentos de *qPCR* muestran resultados similares a los observados en el análisis de RNAseq. Cuando se compara con la estirpe silvestre, la expresión de *nodA* aumenta significativamente en ausencia de NolR, NodD2 y SyrM y no se activa en ausencia de NodD1, mientras que la falta de TtsI sólo tiene un efecto leve sobre la expresión de este gen en presencia de genisteína. La expresión de *nodD1* no presenta variaciones notables en ninguno de los fondos mutantes estudiados en presencia de genisteína con respecto a la estirpe silvestre en ausencia de este flavonoide. El nivel de inducción de *ttsI* fue mayor en los fondos *nolR*, *syrM*, y, sobre todo en *nodD2*, y fue prácticamente inexistente en el fondo *nodD1*. La inducción de *nodD2* se abole en el fondo *nodD1* y disminuye en más de un 50% en ausencia de SyrM. Con respecto a *nolR*, su nivel de expresión en todos los fondos estudiados en presencia de genisteína no es diferente del nivel de expresión del mismo en el fondo silvestre en ausencia de dicho flavonoide, lo que no cuadra con los datos de RNAseq que muestran una menor expresión de *nolR* en el fondo *syrM*. Finalmente, el análisis por *qPCR* del gen *syrM* reveló que su inducción depende de NodD1 en presencia de genisteína y que es reprimida tanto por NodD2 como por NolR, aunque el *fold change* obtenido por experimentos de *qPCR* es mayor al que se observa en el análisis por RNAseq (**Tabla 31**).

Tabla 31. Correlación entre los experimentos de RNAseq y qPCR para los genes reguladores del regulón *nod*. Los valores de *fold change* están referidos a la expresión de cada gen en presencia de genisteína respecto al valor obtenido en la estirpe silvestre crecida en ausencia de genisteína.

ID del gen	Nombre del gen	Fold change RNAseq en distintos fondos						Fold change qPCR en distintos fondos					
		Silvestre	<i>nodD1</i>	<i>ttsI</i>	<i>nodD2</i>	<i>nolR</i>	<i>syrM</i>	Silvestre	<i>nodD1</i>	<i>ttsI</i>	<i>nodD2</i>	<i>nolR</i>	<i>syrM</i>
psfHH103d_126	<i>nodA</i>	17,65	0,72	14,68	233,98	102,56	77,22	30,31	1,19	15,03	225,45	244,16	201,55
psfHH103d_386	<i>nodD1</i>	0,80		0,76	1,36	0,96	0,85	1,56		0,83	1,96	1,16	1,97
psfHH103d_323	<i>ttsI</i>	10,09	0,82		51,79	26,68	17,76	13,27	2,82		98,36	61,53	28,84
psfHH103d_320	<i>nodD2</i>	6,60	0,92	6,95 ^a		4,38	2,56	6,04	0,40	35,51		5,36	2,73
SFHH103_02239	<i>nolR</i>	0,99	0,93	1,20	0,54		0,32	1,18	1,96	2,45	1,67		0,79
psfHH103d_367	<i>syrM</i>	5,81	0,86	9,29	13,36	8,23		6,51	0,45	9,80	43,51	56,75	

^a Se resalta en naranja aquellos datos en los se observan diferencias entre los valores obtenidos por RNAseq y por qPCR.

2.3. Experimentos de doble híbrido de NodD1 y NodD2.

Para estudiar si estos reguladores (NodD1, TtsI, NodD2, NolR y SyrM) interactúan entre ellos o forman complejos con un mismo tipo de proteína, decidimos realizar ensayos de doble híbrido. Hasta la fecha, sólo hemos podido realizar estos ensayos con las proteínas NodD1 y NodD2, con la intención de realizarlos también con los otros reguladores en un futuro próximo. Para ello, clonamos los genes *nodD1* y *nodD2* en los plásmidos pKT25, pKNT25, pUT18 y pUT18C, utilizando los sitios de restricción de las enzimas *KpnI* y *XbaI*, tal como se describe en el capítulo 3 (2.9. Doble híbrido). Analizamos las interacciones entre NodD1 y NodD2 (8 combinaciones) así como de las proteínas consigo mismas (4 combinaciones para cada proteína) por si forman homodímeros. Para estudiar si hay interacción, las células cotransformadas se sembraron en placas de LB con los antibióticos de selección de ambos plásmidos, genisteína y X-Gal como sustrato revelador de la interacción y se dejaron incubar 24 horas a 30°C. En estos primeros resultados (no mostrados) observamos que sí hay interacción de la proteína NodD2 consigo misma, pero las posibles interacciones NodD1/NodD2 y NodD1/NodD1 no quedaban claras.

A continuación, para confirmar las interacciones que habíamos visto y comprobar que realmente no hay interacción entre NodD1/NodD2 y NodD1/NodD1, inoculamos algunas de las colonias obtenidas en la cotransformación en tubos con medio LB líquido suplementado con ampicilina y kanamicina (antibióticos de selección de ambos plásmidos) y los dejamos en agitación 24 horas a 30°C. Al día siguiente, pusimos una gota de cada tubo inoculado en placas de medio LB sólido suplementado con Ampicilina, Kanamicina, X-Gal, genisteína e IPTG y en placas de medio McConkey suplementado con los mismos antibióticos, genisteína y maltosa 1%, y de nuevo dejamos las placas a 30°C hasta el día siguiente. Los resultados obtenidos confirmaron que existía una interacción de la proteína NodD2 consigo misma, y también se detectaron posibles interacciones débiles NodD1/NodD1 y, de modo más claro, NodD1/NodD2 (**Figura 45**).

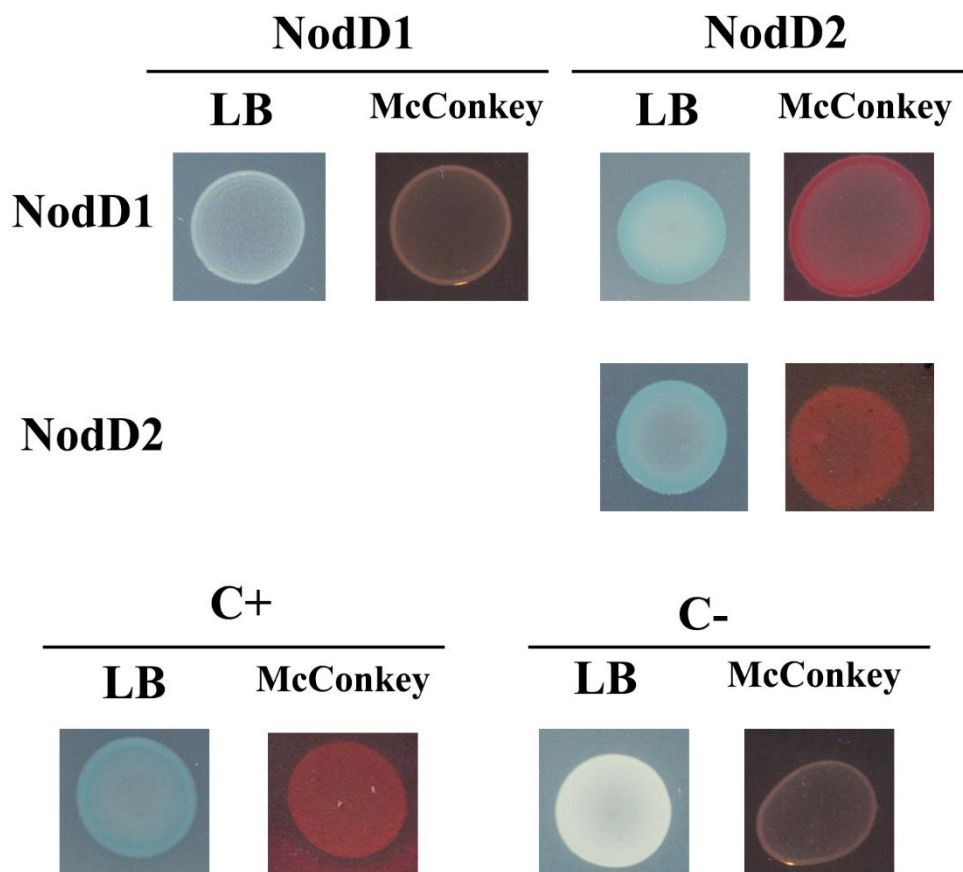


Figura 45. Ensayo de doble híbrido. Las gotas se pusieron en placas de LB suplementadas con Kanamicina (Km), Ampicilina (Ap), X-Gal, genisteína e IPTG y en medio McConkey suplementado con Km y Ap, genisteína y maltosa. Como control positivo se utilizaron los plásmidos pUT18C-zip y pKT25-zip. Como control negativo se utilizaron los plásmidos vacíos cotransformados con los plásmidos pKT25, pKNT25, pUT18 y pUT18C que contenían el gen *nodD1* clonado.

2.4. Los mutantes de *S. fredii* HH103 en *nodD2* y *nolR* no nodulan *L. japonicus* Gifu cuando se inactiva *nodA*.

S. fredii HH103 nodula efectivamente *L. burttii* pero forma nódulos inefectivos en *L. japonicus* Gifu (Sandal *et al.*, 2012). Sin embargo, los mutantes de HH103 en *nolR* y *nodD2* inducen la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en *L. japonicus* Gifu y es probable que este fenotipo se deba a que la mutación de estos genes da lugar a una sobreproducción de factores Nod en presencia de exudados de *Lotus* (Acosta-Jurado *et al.*, 2019). Para confirmar esta hipótesis, decidimos construir dobles mutantes en los que estuvieran mutados uno de estos genes reguladores junto con el gen *nodA* (cuya mutación impide la producción de factores Nod y da lugar a un fenotipo Nod⁻ en las diversas leguminosas hospedadoras probadas, incluyendo *L. burttii* (Acosta-Jurado *et al.*, 2016a)). Para ello, se introdujeron mediante conjugación triparental los plásmidos pMUS689

(*nodD2::Ω*) y pMUS692 (*nolR::Ω*) en la estirpe SVQ116 (HH103 Rif^R *nodA::Tn5-lacZ*) y se seleccionaron los transconjugantes correspondientes. Obtuvimos así los dobles mutantes SVQ813 (*nodA::Tn5-lacZ nodD2::Ω*) y SVQ815 (*nodA::Tn5-lacZ nolR::Ω*). Para el estudio del fenotipo simbiótico de estos mutantes en plantas de *L. japonicus* se realizó una primera aproximación utilizando placas de Petri en lugar de jarros Leonard. Comprobamos que ni el mutante en *nodA* (SVQ116) ni ninguno de los dobles mutantes ensayados (SVQ813 y SVQ815) nodulaban esta planta mientras que sí inducen la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en *L. japonicus* Gifu los mutantes en *nolR* y *nodD2*. A continuación estudiamos el fenotipo simbiótico en jarros Leonard de estos dobles mutantes, así como de SVQ548 (SVQ269 *nolR::lacZΔp-Gm^R*) y SVQ787 (SVQ269 *nodD2::lacZΔp-Gm^R*), en plantas de *L. japonicus* Gifu. Los resultados obtenidos mostraron que mientras los mutantes en *nodD2* y *nolR* sí inducen la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en esta planta, ni la estirpe silvestre ni los dobles mutantes SVQ813 y SVQ815 son capaces de inducir la formación de nódulos en *L. japonicus* (Tabla 32), sugiriendo que: i) los factores Nod son esenciales y ii) la sobreproducción de los factores Nod en los mutantes *nolR* y *nodD2* es la responsable de la nodulación efectiva en esta planta.

Tabla 32. Respuesta de *L. japonicus* a la inoculación con *S. fredii* HH103 y sus derivados *nodD2* (SVQ787), *nolR* (SVQ548), *nodA nodD2* (SVQ813) y *nodA nolR* (SVQ815) ^{a, b}.

Inoculante	Número de nódulos	Peso fresco de la parte aérea (mg) ^c
HH103 Rif ^R	Nod-	6,2±1,8
SVQ787 (<i>nodD2</i>)	30,3±13,7	576,7±236,1*
SVQ548 (<i>nolR</i>)	24,1±10,9	422,8±284,7*
SVQ813 (<i>nodA nodD2</i>)	Nod-	12,7±2,9*
SVQ815 (<i>nodA nolR</i>)	Nod-	5,0±1,8

^a Los datos representan la media al menos 5 jarros, cada uno de los cuales contenía 4 plantas. Las medidas se tomaron 56 días después de la inoculación. Todos los tratamientos se compararon individualmente con los valores de la estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. La presencia de un asterisco denota una diferencia significativa con un valor de $p < 0,05$.

^b Los datos mostrados se obtuvieron de un único ensayo de nodulación.

^c El peso fresco de la parte aérea de las plantas no inoculadas fue de 18,6±9,5 mg por jarro.

3. Discusión.

Para mejorar la simbiosis rizobio-leguminosa, y por tanto aumentar el rendimiento de aquellos cultivos con gran importancia agronómica, es fundamental comprender los mecanismos moleculares que rigen esta interacción. El proceso simbiótico implica un intercambio de señales entre ambos simbioses (López-Baena *et al.*, 2016; Jiménez-Guerrero *et al.*, 2017). Los flavonoides exudados por las raíces de la leguminosa inducen la expresión de los genes simbióticos rizobianos a través de la activación de la(s) proteína(s) NodD (Downie, 2010; Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). *S. fredii* HH103 es un rizobio simbiote de soja que tiene un amplio rango de nodulación, probablemente incluye varias decenas de géneros de leguminosas (Margaret *et al.*, 2011) y cuyo genoma está compuesto por un cromosoma y seis plásmidos, siendo pSfHH103d el plásmido simbiótico. Además de los genes *nod* implicados en la producción del esqueleto de los LCOs, diversos genes con función reguladora están presentes en el plásmido simbiótico, incluyendo *syrM*, *ttsI* y dos copias de *nodD* (*nodD1* y *nodD2*) (Vinardell *et al.*, 2015). Recientemente hemos realizado diversos estudios transcriptómicos mediante RNAseq para caracterizar la respuesta de HH103 al flavonoide genisteína, un inductor de los genes *nod* en esta estirpe (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b; Acosta-Jurado *et al.*, 2020; datos no publicados). Los datos transcriptómicos obtenidos confirman que en HH103 NodD1 es el regulador principal de los genes de nodulación, cuya transcripción se activa en presencia de genisteína al unirse NodD1 a las NB. La NB2 y NB8 son responsables, respectivamente, de la expresión de *nodZnoeLnolK* y *nodABCInolO'noeI*, genes responsables de la síntesis, exportación, metilación y fucosilación de los diferentes factores Nod de HH103 (Vinardell *et al.*, 2015). Pero, además de los genes implicados en la síntesis de los factores Nod, NodD1 regula positivamente otros genes. Entre estos genes inducidos por genisteína y NodD1 se encuentra *ttsI*, el regulador transcripcional del T3SS, cuya expresión está controlada por NodD1 mediante la NB18 (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). Otras NB de HH103 controlan la expresión de genes relacionados con la simbiosis. La NB14 controla la expresión de los genes *fixABCX*, conservados en los rizobios y esenciales para la fijación de nitrógeno en la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa, donde probablemente codifican un complejo de membrana que participa en la transferencia de electrones a la nitrogenasa (Edgren y Nordlund, 2004). La expresión de *psfHH103d_257*, gen presuntamente involucrado en la síntesis de ácido indol acético (AIA), una fitohormona relacionada con el crecimiento radicular de la planta, está controlada por la NB15 (Vinardell *et al.*, 2015). La producción de AIA inducida por flavonoides también se ha observado en *S. fredii* NGR234 y *Rhizobium tropici* CIAT899 (Theunis *et al.*, 2004;

del Cerro *et al.*, 2015a). La NB1 controla los genes psfHH103d_373 a psfHH103d_370, relacionados con la síntesis de hopanoides en algunos rizobios, aunque no en HH103, ya que esta estirpe no sintetiza hopanoides, al menos en las condiciones estudiadas (capítulo 2 de esta Tesis). La inactivación de sus ortólogos en *Bradyrhizobium* sp. y *B. diazoefficiens*, cuya expresión no está regulada por una NB, afecta negativamente a la supervivencia de la bacteria en condiciones de estrés y al rendimiento simbiótico bacteriano con sus leguminosas hospedadoras (Silipo *et al.*, 2014). El gen psfHH103d_161 está bajo el control de la NB9 y se induce notablemente en presencia de genisteína (*fold change* + 21,6). Este gen codifica una proteína hipotética que es 58% idéntica a PsiB de *R. leguminosarum* biovar *phaseoli*, donde se ha postulado que es un inhibidor de la producción de EPS. Por ello, la proteína codificada por el gen psfHH103d_161 era un candidato ideal a estar involucrado en la represión del EPS de HH103 en presencia de genisteína (Acosta-Jurado *et al.*, 2016b). Sin embargo, en nuestro laboratorio se ha obtenido un mutante en dicho gen, y éste no muestra diferencias con la estirpe silvestre en cuanto a la regulación de la producción de EPS en presencia de genisteína (datos no publicados). La NB13 y la NB17 controlan la expresión de los genes psfHH103d_448 y psfHH103d_208 respectivamente. El gen psfHH103d_208 codifica para un posible transportador periplásmico tipo ABC que contiene un dominio presente en la superfamilia OppA (transporte de oligopéptidos). El gen psfHH103d_448 codifica una proteína hipotética que no está presente en otros rizobios, ni siquiera en otras estirpes de *S. fredii*, y que contiene un dominio de recepción de señal (REC) que sugiere su pertenencia a un sistema regulador de dos componentes. El inicio del estudio de estos dos genes se ha abordado en el capítulo 1 de esta Tesis, aunque nos hemos limitado a estudiar el fenotipo simbiótico de mutantes en estos genes en soja. Curiosamente, ambos mutantes inducen la formación de una mayor masa nodular que la estirpe silvestre, pero en ninguno de ellos se produce un aumento significativo de la eficiencia de la interacción medida como peso seco de la parte aérea de las plantas.

Como ya hemos mencionado, uno de los genes de HH103 controlados por una NB es *ttsI* (López-Baena *et al.*, 2008; Vinardell *et al.*, 2015), que codifica el regulador positivo de los genes del T3SS a través de su unión a las TB. El T3SS es un aparato especializado de secreción de proteínas presentes en algunas bacterias Gram negativas, y que es usado tanto por bacterias patógenas como simbióticas para liberar proteínas efectoras (denominadas Nops en los rizobios) directamente en la célula eucariota hospedadora para interferir con las cascadas de transducción de señales del huésped y promover la simbiosis

o patogénesis suprimiendo las defensas del huésped (Soto *et al.*, 2006; Jiménez-Guerrero *et al.*, 2015). El análisis por RNAseq de HH103 reveló la presencia de once TB activas en esta estirpe. Las TB5, 8, 10 y 12 controlan la expresión de operones que codifican para proteínas que son componentes del aparato del T3SS, que traslocan proteínas al citoplasma de la célula de la raíz o que son enzimas glicolíticas. El resto de estas *tts boxes* controlan la expresión de genes que codifican para proteínas efectoras (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). Es interesante resaltar que TtsI parece tener papeles adicionales al ser el simple inductor del T3SS simbiótico de HH103. Así, TtsI influencia la movilidad en superficie inducida por genisteína (nuestros datos no publicados), seguramente, al menos en parte, a través de la inducción de *flgJ*, SFHH103_00347 y SFHH103_00348 vía una nueva TB caracterizada en esta Tesis (ver capítulo 3). Pero, además, el análisis de los datos de RNAseq muestra que TtsI induce la expresión de diversos DEGs del regulón *nod* para los que no se ha descrito una TB: SFHH103_03749 (un regulador tipo TetR) (**Tabla 28**), y SFHH103_00844 (un regulador con un dominio *Zinc-finger*), SFHH103_01920 y psfHH103d_275 y psfHH103d_274 (**Tabla 27**), así como reprime la expresión de SFHH103_01317 y SFHH103_02323 (*hmuU*) (**Tabla 27**). En este momento desconocemos si este efecto regulador es directo o indirecto, y si estos genes pudieran contener TB con secuencias alejadas de la consenso

Además, el análisis por RNAseq de HH103 muestra que SyrM es un regulador transcripcional importante no solo en presencia de genisteína, sino también en su ausencia (Acosta-Jurado *et al.*, 2020). La expresión de *syrM* es relativamente baja en ausencia de flavonoides (unas 100 lecturas de 40×10^6 lecturas de todo el transcriptoma), pero se induce unas 6 veces por NodD1 y genisteína a través de la NB19. A su vez, SyrM, está involucrado en la regulación de gran cantidad de genes tanto en *S. meliloti* como en *S. fredii* HH103 (Barnett y Long, 2015; Acosta-Jurado *et al.*, 2020), presuntamente mediante su unión a secuencias denominadas SyrM *boxes* (SB). Sin embargo, a pesar del gran impacto que tiene SyrM en la regulación génica en HH103, sólo se han encontrado SB bien conservadas aguas arriba de dos operones que se inducen diferencialmente en presencia de genisteína (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b; Acosta-Jurado *et al.*, 2020), lo que indica que aún estamos lejos de comprender como SyrM ejerce su efecto. Uno de los genes que se encuentran precedidos por una SB es *nodD2*. Por tanto, SyrM, cuya expresión se ha inducido previamente por NodD1 y genisteína, se une a esta secuencia y actúa como un regulador transcripcional positivo de *nodD2*. Así, no es de extrañar que algunos genes influenciados por NodD2 también lo estén por SyrM (como, por ejemplo,

psfHH103d_257, NB15, cuya expresión es activada por ambos reguladores). Pero también existen genes que son activados por *syrM* y sobre los que NodD2 no parece tener efecto, como es el caso de psfHH103d_118 (NB9) (**Tabla 23**). Curiosamente, NodD2 reprime la expresión de *SyrM* (Acosta-Jurado *et al.*, 2019; nuestros datos no publicados) aunque se desconoce si este efecto es solo directo o también ocurre a través de la represión de NodD1, ya que aguas arriba de *nodD1* se localiza una NB en sentido opuesto que puede regular la expresión de dicho gen. De hecho, estudios previos en otras estirpes de *S. fredii*, USDA191 y USDA257, muestran que la transcripción de *nodD1* se reduce notablemente en presencia de copias extra del gen *nodD2* (Machado *et al.*, 1998). Además, NodD2 desempeña un papel dual: por un lado, actúa como un represor de muchos genes, incluyendo aquellos genes de nodulación involucrados en la producción de los NFs y genes relacionados con el T3SS. Por otro, NodD2 actúa como un regulador positivo de algunos genes inducibles por flavonoides y dependientes de NB como genes involucrados en la producción de ácido indol acético (Acosta-Jurado *et al.*, 2019). El análisis transcriptómico reveló que *SyrM* no solo es un activador de *nodD2*, sino que además también lo es de *nolR*, cuyo producto es un regulador global que, en lo que se refiere a genes relevantes para la simbiosis, reprime los genes involucrados en la producción de factores Nod y secreción de Nops pero regula positivamente la producción de EPS (Vinardell *et al.*, 2004a; Acosta-Jurado *et al.*, 2016a; 2020). Sin embargo, desconocemos el mecanismo por el que *SyrM* interviene en la expresión de dicho regulador. En cuanto al efecto mayoritariamente represor de *NolR* sobre el regulón *nod* de HH103, en la mayoría de los casos puede explicarse por la presencia de *NolR boxes* bien conservadas delante de los genes reprimidos, como es el caso de los dos operones que contienen todos los genes necesarios para la síntesis y decoración de los NFs (NB2 y NB8) (Acosta-Jurado *et al.*, 2019; nuestros datos no publicados).

El análisis transcriptómico por *RNAseq* y el estudio de diversas características reguladas por genisteína nos ha permitido profundizar más en el regulón *nod* y comprender mejor cuál es el papel que desempeñan los reguladores en la regulación de la expresión del resto de genes en presencia de genisteína. Nuestros datos sugieren que la presencia de flavonoides dispara una serie de acontecimientos destinados al cambio de estilo de vida desde un modo saprófito a un modo simbiótico (Poole *et al.*, 2018): activación de la producción de dos señales simbióticas (factores Nod y efectores secretados mediante T3SS), represión de la producción de un polisacárido de relevancia simbiótica (EPS) e inducción de la movilidad en superficie.

Respecto a la expresión génica, en primer lugar, 6 de los 100 DEGs en presencia de genisteína son independientes de la presencia de NodD1, lo que sugiere una regulación aguas arriba de este regulador positivo (Pérez-Montaña *et al.*, 2016b). Entre esos genes se encuentra un grupo de genes cromosómicos, SFHH103_05321-SFHH103_05319, cuya expresión se reprime en presencia de genisteína. SFHH103_05321 codifica un regulador transcripcional tipo TetR, y SFHH103_05319 y SFHH103_05320 dos (MdtE y MdtC) de los tres componentes de una bomba de expulsión de tóxicos de la familia RND (*Resistance-Nodulation-cell Division*). En *Pseudomonas syringae* pv. DC3000 tomato (Vargas *et al.*, 2011) las proteínas ortólogas que conforman este complejo juegan un papel esencial en la expulsión de flavonoides, por lo que su inactivación eleva la susceptibilidad de este patógeno a estos compuestos y reduce su grado de virulencia. En *S. meliloti* GR4, las proteínas ortólogas a SFHH103_05321-SFHH103_05319 (Smb20347-Smb20345) codifican el regulador transcripcional y dos componentes de una bomba que probablemente esté implicada en el transporte de diversas moléculas señal como AHLs y volátiles como la 2-tridecanona (2-TDC). Dicha bomba es necesaria para el incremento en movilidad en superficie que se produce en esta bacteria en respuesta a la presencia de 2-TDC, pero no tiene influencia en las propiedades simbióticas de la bacteria (Calatrava-Morales, 2017). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio con los genes SFHH103_05321-SFHH103_05319 (Almozara-García, 2019) sugieren que esta bomba se reprimiría en presencia de genisteína para permitir la entrada (o impedir la expulsión) de este flavonoide, lo que podría ser trascendental para permitir la activación del regulón *nod*. Interesantemente, la inactivación de SFHH103_05321, que codifica el regulador transcripcional, abolió la movilidad en superficie inducida por genisteína de HH103, lo que, junto con los resultados obtenidos en *S. meliloti* GR4, sugieren que este grupo de genes está implicado en la inducción de la movilidad en superficie en *Sinorhizobium*, pero quizás atendiendo a distintas señales según el rizobio concreto.

El resto de DEGs de HH103 en presencia de genisteína, 94, muestran una dependencia de la presencia de NodD1, que se confirma como el regulador principal del sistema. Parte de su acción la ejerce directamente a través de su probable unión (no demostrada) a NB, y otra parte induciendo la expresión de otros reguladores transcripcionales, bien directamente como es el caso de TtsI y SyrM (regulados mediante NB) o indirectamente, como es el caso de NodD2 (cuya expresión es activada por SyrM mediante una SB). En esta Tesis hemos demostrado que TtsI no sólo activa el T3SS simbiótico de HH103, sino que además activa al menos parte de la movilidad en superficie dependiente de genisteína

en esta estirpe e induce a otros genes. También, nuestros estudios con SyrM han permitido saber que este regulador es necesario para la represión de la producción de EPS observada en HH103 y que depende de NodD1 y genisteína (Acosta-Jurado *et al.*, 2016b; 2020), aunque aún desconocemos los genes responsables de esta represión (presuntamente regulados por SyrM). El papel de NodD2 resulta por ahora una incógnita y abre numerosos interrogantes: dentro de los genes dependientes de NB ¿cómo actúa como represor de algunos, como los implicados en producción de factores Nod, y activador de *psfHH103d_257*, presuntamente implicado en la producción de AIA, y no afecta a la de otros como *psfHH103d_448*? ¿es capaz de unirse a NB? ¿es capaz de formar heterooligómeros con NodD1 y regular la afinidad de éste por NB concretas? Los ensayos de doble híbrido realizados con NodD1 y NodD2 muestran que cada una de estas proteínas es capaz de interactuar consigo misma (aunque más claramente en el caso de NodD2) y que, además, también existe interacción entre NodD1 y NodD2. Son necesarios estudios de interactómica para confirmar estos resultados, sobre todo en lo referente a la interacción NodD1-NodD1. Para ello nos planteamos en un futuro purificar ambas proteínas y utilizar el Biacore para ver si hay interacciones biomoleculares (interacciones proteína-proteína, proteína-ADN...) en presencia y ausencia de flavonoides.

Además, SyrM también activa fuertemente la expresión de *nolR*, si bien no conocemos como tiene lugar esta activación ya que a diferencia de *nodD2*, el gen *nolR* no está precedido por ninguna SB conocida. NolR reprime a TtsI pero potencia tanto movilidad en superficie como producción de EPS. NodD2 reprime a TtsI y a SyrM, por lo que existe un bucle de retroalimentación entre SyrM y NodD2: La represión de SyrM por parte de NodD2 conlleva a una represión de NodD2 y NolR debido a la inactivación de su regulador positivo. En ausencia de NodD2 y NolR, la expresión de TtsI, cuyo gen estaba reprimido por estos reguladores, y la de SyrM vuelve a activarse, lo que a su vez activa de nuevo la expresión de NolR y NodD2.

Para intentar profundizar en estas relaciones entre los distintos reguladores que da lugar a esta modulación fina de la expresión de los diferentes componentes del regulón *nod*, en nuestro laboratorio hemos iniciado una estrategia consistente en estudiar la expresión de cada gen regulador (interrumpido por el casete *lacZΔp-Gm^R*) en fondos genéticos donde cada uno de los otros genes reguladores está interrumpido por el interposón Ω o delecionado, y compararla con aquella que tiene lugar en la estirpe silvestre (**Figura 46**). Estos experimentos, consistentes en ensayos de actividad β -galactosidasa que se están realizando tanto en presencia como en ausencia de genisteína,

informarán de cómo se afectan los niveles de transcripción de cada regulador. Aun así, estos experimentos complementarán los datos de RNAseq y qPCR, que muestran los niveles de acumulación de los respectivos mensajeros (resultado no sólo de la transcripción sino también de su posible regulación post-transcripcional). De esta manera se están analizando por ensayos β -galactosidasa la expresión de *nodD1*, *ttsI*, *nodD2*, *nolR* y *syrM* cuando se inactivan los otros genes reguladores. Estos experimentos no se han incluido en la parte de resultados puesto que no hemos podido finalizar algunas de las construcciones que contienen los genes *ttsI* y *syrM* interrumpidos por el casete *lacZ* Δ p-Gm^R.

Los datos obtenidos por ensayos de actividad β -galactosidasa la expresión de *nodD1* en los distintos fondos mutantes muestran diferencias con los resultados de RNAseq y su posterior validación por qPCR, ya que mientras que por RNAseq en presencia de genisteína no se observan importantes diferencias en la expresión de *nodD1* en ninguno de los fondos mutantes estudiados con respecto a HH103 en ausencia de este flavonoide, los ensayos de actividad β -galactosidasa muestran como NodD1 se activa por NodD2 y se reprime por NolR, un regulador negativo de *nodD1* a través de su unión a una NolR *box* que lo precede, tanto en presencia como en ausencia de genisteína. La acción activadora de NodD2 es inesperada y claramente contradictoria con lo observado en otras estirpes de *S. fredii* como USDA257 y USDA191. Una posibilidad es que, en ausencia de NodD1, la proteína NodD2 tenga efectos diferentes a los que tiene en la estirpe silvestre. Por ello, quizás sería conveniente realizar estos ensayos en un fondo que tuviera a la vez una copia silvestre de *nodD1* y otra fusionada al gen informador. El papel represor de NolR sobre la expresión del gen *nodD1* ya se había observado en estudios anteriores realizados también mediante ensayos de actividad β -galactosidasa (Vinardell *et al.*, 2004b). La inactivación de *nodD1*, *ttsI*, *nodD2* y *syrM* no afecta a la expresión de *nolR* ni en presencia ni en ausencia de este flavonoide. La expresión de *nodD2* está regulada por NodD1 de forma positiva y NolR de forma negativa, pero no depende de la inactivación de *syrM*. Este resultado no se corresponde con el análisis transcriptómico, en el que observamos que SyrM actúa como regulador positivo de NodD2 y, por tanto, la inactivación de *syrM* se traduciría en una disminución de la expresión de este gen (**Figura 46**).

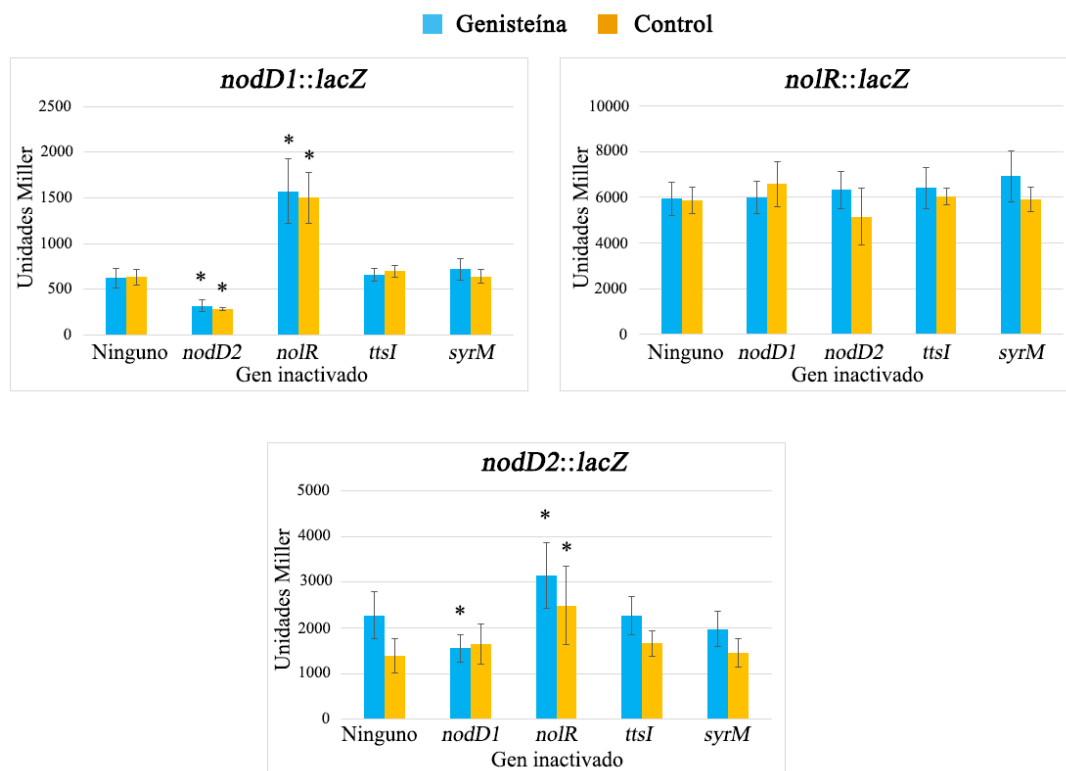


Figura 46. Ensayos de actividad β -galactosidasa de los genes *nodD1*, *nolR* y *nodD2* en diferentes fondos mutantes en los genes *nodD1*, *nodD2*, *nolR*, *ttsI* y *syrM* en ausencia (barras amarillas) y presencia de genisteína (barras azules). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en el mutante simple en las mismas condiciones. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores con * son significativamente diferentes de los obtenidos en el mutante simple *lacZ* al nivel $\alpha = 5\%$. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos con dos réplicas.

Además, para complementar estos experimentos, estamos realizando ensayos de actividad β -galactosidasa para estudiar el efecto de la sobreexpresión de los genes *nodD1*, *nodD2*, *nolR*, *ttsI* y *syrM* en los distintos fondos donde uno de estos reguladores está interrumpido por el casete *lacZ* Δ p-Gm^R (**Figura 47**). Como control, también se incluye un fondo donde el gen *nodA* está interrumpido por el transposón Tn5-B20 que porta un gen *lacZ* carente de promotor (Vinardell *et al.*, 2004b). Estos experimentos tampoco se han incluido en la parte de resultados porque aún no hemos obtenido una construcción en un vector estable que porte el gen *syrM* de HH103. La sobreexpresión de *nolR* en presencia de genisteína conduce a la disminución de la expresión de todos los genes de estudio incluyendo su autorrepresión, por lo que NolR reprime la producción de factores Nod, al T3SS y modula su propia expresión. Curiosamente, cuando se sobreexpresa NodD1 no hay aumento de inducción de *ttsI* y sólo un ligero incremento de la expresión de *nodA*, además de una clara autorregulación negativa. Estos datos parecen indicar que la inducción de estos genes ya es muy elevada en la estirpe silvestre (una sola copia de

nodD1), por lo que no responde demasiado a la presencia de copias adicionales de *nodD1* y/o que la autorregulación negativa de *nodD1* compensa de alguna manera el que haya varias copias de este gen, de tal manera que el número de copias de la proteína NodD1 en la bacteria no se altere demasiado respecto a la condición silvestre. Asimismo, la sobreexpresión de *nodD2* reprime a *nodA*, *nodD1* y a su propia expresión en presencia de genisteína y a *syrM* en ausencia de este flavonoide. Este resultado de la sobreexpresión de *nodD2* sobre *nodD1* sí está de acuerdo con el papel represor de NodD2 sobre *nodD1* que se había observado en estudios de RNAseq y qPCR, pero no con lo observado en el fondo *nodD1::lacZ* cuando se mutaba *nodD2* (Figura 46). Por ello, creemos necesario estudiar estas interacciones en un fondo que contenga simultáneamente una copia silvestre de *nodD1* y otra fusionada a *lacZ*. Asimismo, resulta extraño que la sobreexpresión de NodD2 no afecte (solo una pequeña reducción, no significativa) a la inducción de *ttsI* en presencia de genisteína: quizás se deba también a que la autorregulación negativa de *nodD2* compensa el mayor número de copias de este gen. Finalmente, la sobreexpresión de *ttsI* da lugar a una ligera, pero significativa, reducción de la expresión de *syrM* en presencia de genisteína, lo que es coherente con la mayor expresión de *syrM* detectada tanto por RNAseq como por qPCR en el mutante *ttsI*. Ello parece añadir un mayor grado de complejidad al regulón *nod* de HH103 y darle aún mayor funcionalidad a TtsI dentro de este regulón. Los experimentos de actividad β -galactosidasa del mutante *syrM::lacZ* en el fondo mutante *ttsI::\Omega* serán de gran importancia para ver si se confirma este nivel de interacción entre estos dos reguladores, que podría ser relevante en simbiosis con plantas hospedadoras. Por ejemplo, la mutación en *nodD1* impide la nodulación con soja y la mutación en *ttsI* tiene efectos negativos sobre esta interacción simbiótica, pero curiosamente, la sobreexpresión de *ttsI* en un mutante *nodD1* es capaz de inducir la producción de algunos nódulos en algunas de las plantas inoculadas (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2015). Sería interesante estudiar si la expresión del gen *nodA* se incrementa en estas condiciones respecto a la presente en el mutante *nodD1*, aunque fuera ligeramente, por una menor expresión de *syrM*. En caso positivo, podría analizarse si hubiera un posible aumento en la producción de factores Nod.

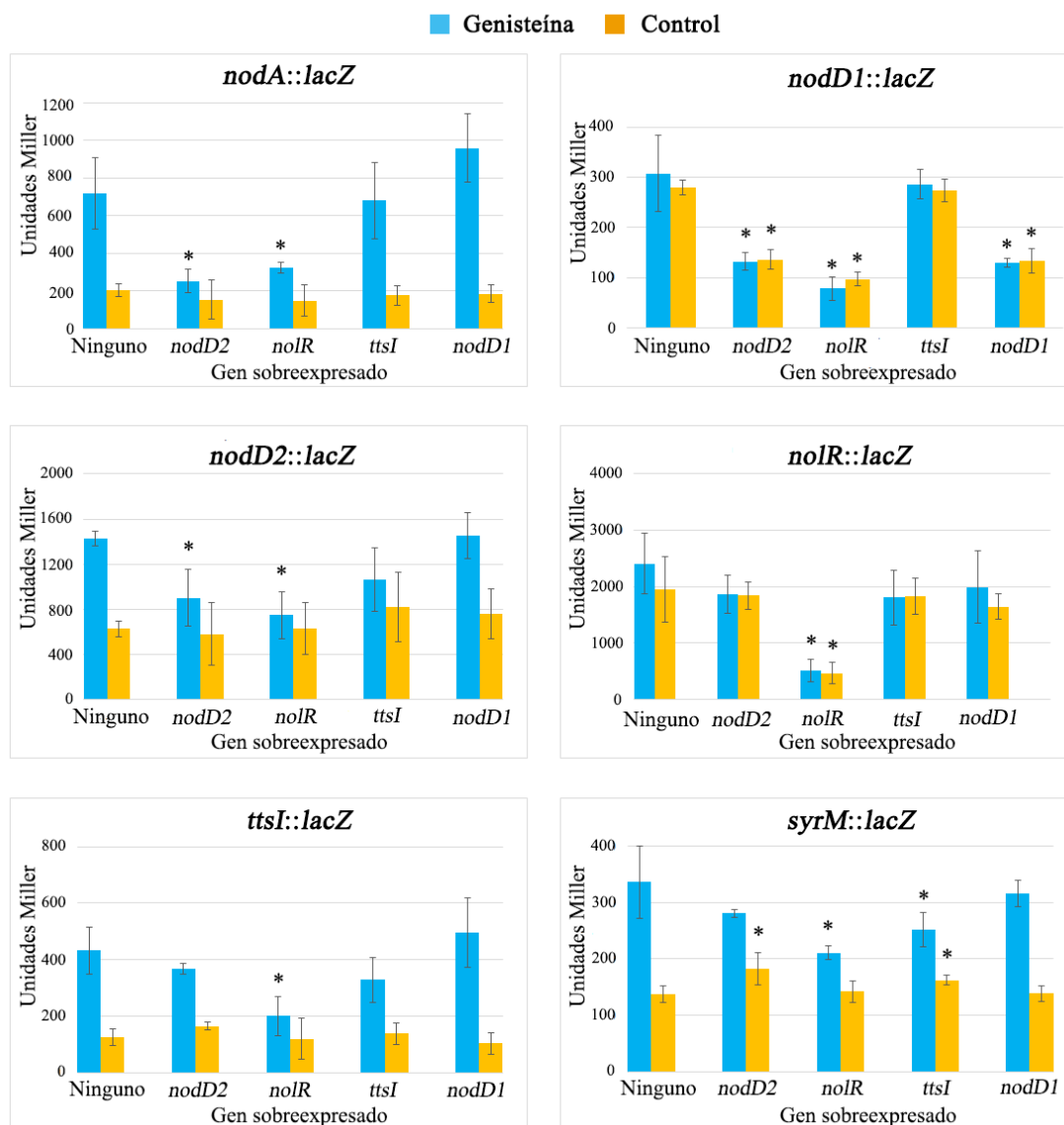


Figura 47. Ensayos de actividad β -galactosidasa para el estudio de la sobreexpresión de los diversos reguladores en cada fondo regulador::*lacZ*, en ausencia (barras amarillas) y presencia de genisteína (barras azules). Todos los tratamientos se compararon con los datos obtenidos en el mutante simple en las mismas condiciones. Los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney. Los valores con * son significativamente diferentes de los obtenidos en el mutante simple *lacZ* al nivel $\alpha = 5\%$. Los datos representados corresponden a la media de tres experimentos con dos réplicas.

Por tanto, en *S. fredii* HH103, la regulación de los genes simbióticos por flavonoides es bastante compleja e involucra a NodD1, TtsI, NolR, NodD2 y SyrM. La **Figura 48** muestra un modelo que supone una visión simplificada del regulón *nod*, en la que aún hay que integrar otras relaciones entre los reguladores así como la participación de otros reguladores que han mostrado influir en este regulón como MucR1 (Acosta-Jurado *et al.*, 2016c). En HH103, los flavonoides ejercen la mayor parte de su efecto en expresión génica a través del regulador NodD1, que potencia la producción de factores Nod, la expresión del T3SS y la movilidad en superficie (vía inducción de TtsI), y la represión de

la producción del EPS (vía SyrM). SyrM a su vez induce directamente a NodD2, que actúa como represor de SyrM y de TtsI, y de la producción de factores Nod. SyrM además induce, de modo directo o indirecto, a NoIR, que a su vez reprime T3SS y producción de factores Nod, pero induce la producción de EPS y es necesario para la movilidad en superficie inducida por NodD1 y genisteína.

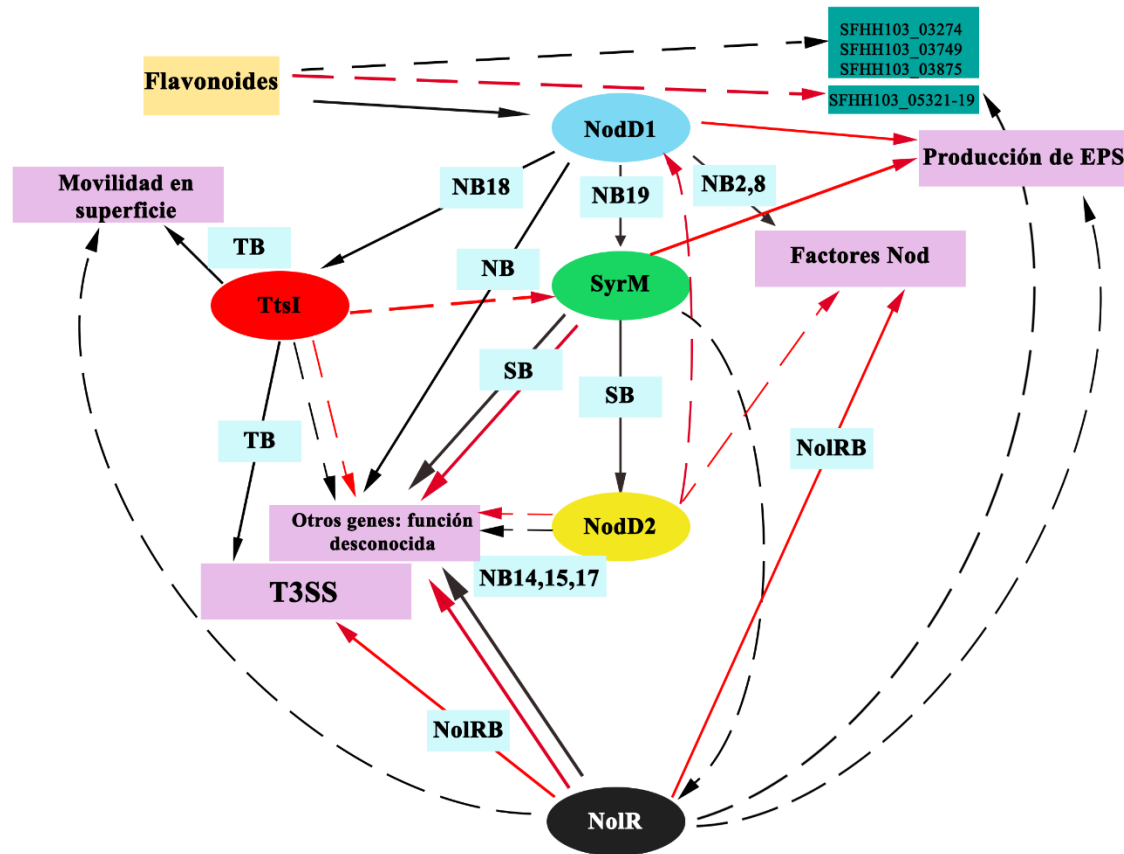


Figura 48. Esquema de modulación de la expresión del regulón *nod* mediada por los principales reguladores en *S. fredii* HH103. NB: *nod box*, SB: *SyrM box*, NoIRB, NoIR *box*. La inducción y represión de los genes (y procesos) se indican con flechas negras y rojas, respectivamente. Las flechas discontinuas indican que la activación podría ser directa o indirecta, y que podrían participar elementos reguladores desconocidos.

Las relaciones de regulación entre proteínas NodD y proteínas SyrM parecen comunes en estirpes del género *Sinorhizobium*. En *S. meliloti* Rm1021 hay tres copias distintas de NodD: NodD1 y NodD2, que requieren de compuestos específicos de la planta para activar la expresión de los genes *nod*, y NodD3, que activa la expresión de los genes *nod* sin necesidad de interactuar con flavonoides. Hace falta inactivar los tres genes *nodD* para obtener un fenotipo Nod^- con alfalfa (Schlaman *et al.*, 1998). En esta bacteria, SyrM, activa levemente su propia expresión y notablemente la de NodD3, que a su vez activa la de SyrM y la de los genes *nodABC* (Mulligan y Long., 1989; Swanson *et al.*, 1993; Barnett *et al.*, 1996; Barnett y Long, 2015). Así, en esta bacteria NodD3 y SyrM

conforman un circuito regulador positivo. Por otro lado, SyrM induce la expresión de *syrA*, cuyo producto es un activador de la expresión de genes involucrados en la biosíntesis de succinoglicano: las estirpes que tienen múltiples copias de *syrM* y *syrA* forman colonias extremadamente mucosas (Mulligan y Long., 1989; Swanson *et al.*, 1993; Barnett *et al.*, 1996; 1998). Tanto *nodD3* como *syrA* tienen SyrM *boxes* bien conservadas en sus regiones promotoras (Barnett y Long, 2015). Como ocurre en *S. fredii* HH103, SyrM en *S. meliloti* actúa como una proteína reguladora global que conecta la producción de al menos dos señales simbióticas bacterianas, la biosíntesis de NFs vía *nodD3* y la producción del EPS vía *syrA* (Barnett y Long, 1997). Por su parte, la estirpe *S. fredii* NGR234 posee dos copias de *nodD*, *nodD1*, regulador principal y esencial para la nodulación con todas sus plantas hospedadoras, y *nodD2*, involucrado en la represión del operón *nodABCINolOnoeI* (Fellay *et al.*, 1998). Esta estirpe también tiene dos copias de *syrM*, *syrM1* y *syrM2*, cuyos productos proteicos son 60 y 99% idénticos a la proteína SyrM de HH103 (Acosta-Jurado *et al.*, 2020). SyrM1 induce positivamente el T3SS y la sulfatación de los NFs (Hanin *et al.*, 1998). El gen *syrM2* se induce por NodD1 y flavonoides a través de la NB19 y actúa como un regulador transcripcional positivo de *nodD2* que a su vez reprime la expresión de *nodD1* y, por tanto, de los genes relacionados con la producción de los NFs (Kobayashi *et al.*, 2004). Estos autores postulan que, gracias a la acción de SyrM2 y NodD2, existe una represión de la producción de NFs a las 24 horas de la inducción de los genes *nod*. En HH103, NodD2 también actúa como un represor de la producción de factores Nod (Acosta-Jurado *et al.*, 2019), y SyrM (que es el ortólogo de SyrM2 de NGR234) también induce a NodD2 y, por tanto, provoca una represión de la producción de factores Nod (Acosta-Jurado *et al.*, 2020). Sin embargo, pensamos que el papel de NodD2 y SyrM es modular finamente la producción de los NFs más que acabar con dicha producción a un determinado tiempo de la inducción inicial. De hecho, en nuestros estudios hemos observado alta expresión de *nodA* incluso 96 horas después de la inducción (Acosta-Jurado *et al.*, 2016b). Debido a que la expresión de *syrM2* en NGR234 y de *syrM* en HH103 es regulada principalmente por NodD1, y NodD2 reprime a NodD1, en *S. fredii* no existe un circuito regulador positivo similar al de SyrM y NodD3 de *S. meliloti*. Por otro lado, existe en NGR234 un gen ortólogo (*y4xQ/NGR234_444*) a *syrA* de *S. meliloti*, que se encuentra localizado aguas abajo de una posible SyrM *box*. Ello sugiere que su expresión puede ser activada a través de SyrM1 o SyrM2 (Hanin *et al.*, 1997; Theunis *et al.*, 2004; Kobayashi *et al.*, 2004; 2008; Barnett y Long, 2015). Sin embargo, que nosotros conozcamos, no existen trabajos que informen

de una posible relación entre alguna de las copias de SyrM de NGR234 y la regulación de la producción de EPS en esta bacteria.

Sinorhizobium fredii HH103 es un rizobio con un amplio rango de hospedador capaz de nodular soja y *L. burttii*, pero es inefectivo con *L. japonicus*. Los estudios que hemos realizado en nuestro laboratorio muestran que la ausencia de NodD2 o NolR incrementa la producción de factores Nod al igual que ocurre cuando está ausente SyrM dónde además se suprime la represión de la producción del EPS mediada por genisteína que tiene lugar en HH103 (Acosta-Jurado *et al.*, 2019; 2020). Además, hemos realizado en nuestro laboratorio ensayos de movilidad en superficie donde observamos que en presencia de genisteína los mutantes en *nodD1*, *ttsI* y *nolR* tienen abolida este tipo de movilidad, mientras que mutantes en *nodD2* y *syrM* presentan una movilidad en superficie ligeramente inferior a la observada en la estirpe parental, pero sin llegar a ser significativamente diferente. En simbiosis, la mutación de cualquiera de estos tres genes afecta negativamente a la simbiosis con soja, pero mejora la efectividad con *L. burttii* y le permite nodular con *L. japonicus* Gifu, aumentando el rango de hospedador de HH103. Lo mismo ocurre con frijol (*Phaseolus vulgaris*) (información personal comunicada por el Dr. Francisco Javier Ollero), otra leguminosa que no es nodulada por HH103. Por lo tanto, mientras que la falta del regulador “principal” del regulón *nod* de HH103 (NodD1) perjudica completamente la simbiosis con todas las leguminosas probadas hasta ahora (Vinardell *et al.*, 2004b, Acosta-Jurado *et al.*, 2016b; 2019), la ausencia de reguladores “secundarios” como NolR, NodD2 o SyrM pueden tener efectos positivos o negativos dependiendo la planta analizada. Quizás, el *fine-tuning* de los genes simbióticos a través de estos reguladores transcripcionales ha evolucionado para mejorar la efectividad simbiótica de esta bacteria con soja, el huésped natural de HH103 (ambos simbioses, bacteria y leguminosa son originarios de China; Ruiz-Sainz *et al.*, 2005; Margaret *et al.*, 2011; Temprano-Vera *et al.*, 2018), incluso cuando esto supone una disminución (o supresión) de la efectividad simbiótica de esta estirpe con otras leguminosas. En otras palabras, *S. fredii* HH103 puede producir señales simbióticas adecuadas para nodular y fijar nitrógeno con *L. japonicus* Gifu o *Phaseolus vulgaris*, pero la presencia de reguladores tales como NodD2, NolR y SyrM modula la expresión de los genes simbióticos de modo para optimizar la simbiosis con su hospedador natural, la soja, y ello puede prevenir la interacción con otras leguminosas (Acosta-Jurado *et al.*, 2019; 2020).

CONCLUSIONES

Conclusiones

1.- En *S. fredii* HH103, la genisteína afecta la expresión de un número considerable de genes, muchos de los cuales aún no han sido estudiados en rizobios. Dos de estos genes son psfHH103d_448 y psfHH103d_208, cuya expresión es controlada por las NB13 y NB17, respectivamente. La inactivación de cualquiera de estos dos genes no tiene efecto en la eficiencia simbiótica de HH103 con soja.

2.- A pesar de que la expresión de los genes psfHH103d_373 a psfHH103d_370, relacionados con la síntesis de hopanoides en otros rizobios, se regule por NodD1 y genisteína a través de la NB1, no hemos detectado producción de hopanoides en HH103 en presencia de este flavonoide. Además, la inactivación de algunos de estos genes tiene poco efecto en la simbiosis de HH103 con soja y *Lotus burttii*.

3.- La expresión de los genes *flgJ*, SFHH103_00347 y SFHH103_00348 está regulada positivamente por NodD1 y TtsI a través una TB imperfecta localizada aguas arriba de *flgJ*, y negativamente por NodD2 y NolR. El papel que desempeña SyrM sobre la expresión de este grupo génico aún está por elucidar. La inactivación de cualquiera de estos genes suprime totalmente la movilidad de tipo *swimming*, y también la movilidad en superficie en los casos de SFHH103_00347 y SFHH103_00348. Además, los mutantes en *flgJ* y en SFHH103_00347 carecen de flagelo, no así el mutante SFHH103_00348. El efecto en simbiosis observado al inactivar estos genes es distinto en función de la leguminosa estudiada y del gen mutado.

4.- La proteína NodD1 de *S. fredii* HH103 es el regulador principal del regulón *nod*, pero los reguladores secundarios NodD2, NolR, TtsI y SyrM juegan un papel clave en la modulación de la expresión de dicho regulón.

5.- La proteína TtsI de *S. fredii* HH103 además de ser el regulador positivo del T3SS, induce la expresión de otros genes del regulón *nod*, entre ellos dos reguladores transcripcionales y el grupo génico *flgJ*-SFHH103_00347-SFHH103_00348, relacionado con la movilidad bacteriana. Además, TtsI tiene efecto represor sobre *syrM*, SFHH103_01317 y SFHH103_02323, aunque desconocemos si este efecto es directo o indirecto.

6.- NolR es un represor de los genes involucrados en la producción de factores Nod y secreción de Nops, pero potencia la síntesis de EPS y la movilidad en superficie en presencia de genisteína. Además, parece ser un inductor del grupo génico

SFHH103_05219-SFHH103_05221, el cual se reprime por genisteína independientemente de NodD1.

7.- SyrM es un regulador transcripcional importante que se induce por NodD1 y genisteína y que está involucrado en la regulación de gran cantidad de genes entre los que se encuentran *nodD2* y *nolR*.

8.- NodD2 regula negativamente la expresión de genes involucrados en la producción de los factores Nod, genes relacionados con el T3SS, y *syrM*, todo ello presuntamente a través de la represión de NodD1. Sin embargo, NodD2 también actúa como un regulador positivo de algunos genes inducibles por flavonoides y dependientes de NB.

9.- Los ensayos de doble híbrido realizados sugieren que NodD2 es capaz de interactuar consigo misma y con NodD1. La capacidad de interacción de NodD1 consigo misma parece débil, al menos con el sistema empleado en esta Tesis.

10.- La capacidad de los mutantes en *nolR*, *nodD2* o *syrM* para nodular efectivamente con *Lotus japonicus* Gifu es dependiente de la producción de factores Nod.

Conclusions

1.-The flavonoid genistein affects the expression of a high number of *S. fredii* HH103 genes; many of them having not been studied in rhizobia so far. Two of these genes are psfHH103d_448 and psfHH103d_208, whose expression is controlled by NB13 and NB17, respectively. The inactivation of any of these two genes has not effect on the HH103-soybean symbiotic effectiveness.

2.- Despite of the fact that the expression of genes psfHH103d_373 to psfHH103d_370, which are related to hopanoids production in other rhizobia, is regulated by NodD1 and genistein through NB1, we have not detected hopanoids production in HH103 in the presence of this flavonoid. Furthermore, the inactivation of some of these genes has little effects on the HH103 symbiotic abilities with soybean and *Lotus burttii*.

3.- The expression of *flgJ*, SFHH103_00347 and SFHH103_00348 is positively regulated by NodD1 and TtsI through an imperfect TB, located upstream of *flgJ*, and negatively regulated by NodD2 and NolR. Further studies are required to elucidate whether SyrM has a role in the expression of this group of genes. The inactivation of any of these genes abolishes swimming motility, as well as the surface motility in SFHH103_00347 and SFHH103_00348 mutants. In addition, inactivation of either *flgJ* or SFHH103_00347, but not that of SFHH103_00348, results in loss of flagellum. The symbiotic phenotype of these mutants differs depending on the host legume analysed and the gene mutated.

4.- The *S. fredii* HH103 regulatory protein NodD1 is the main regulator of the *nod* regulon, but the secondary regulators NodD2, NolR, TtsI and SyrM play a key role in the fine tuning modulation of the *nod* regulon expression.

5.- In *S. fredii* HH103, TtsI is not only the positive regulator of T3SS, but also induces the expression of other genes belonging to the *nod* regulon, including the *flgJ*-SFHH103_00347-SFHH103_00348 genes, which are related to bacterial motility, as well as two transcriptional regulators. In addition, TtsI acts as a repressor of *syrM*, SFHH103_01317, and SFHH103_02323, although whether this effect is direct or indirect remains unknown.

6.- NolR acts as repressor of a high number of HH103 genes, including those related to NFs production and Nops secretion, but also it is an activator of EPS production and surface motility in a genistein-dependent manner. Furthermore, NolR appears to be a

positive regulator of SFHH103_05219-SFHH103_05221 genes, which are repressed by genistein in a NodD1-independent manner.

7.- SyrM is an important transcriptional regulator that is induced by NodD1 and genistein and is involved in the regulation of a large number of genes, including *nodD2* and *nolR*.

8.- NodD2 negatively regulates the expression of genes related to NFs production, T3SS, and *syrM*, presumably through NodD1 repression. However, NodD2 also acts as a positive regulator of some NB-dependent and flavonoid-inducible genes.

9.- Two-hybrid assays suggest that NodD2 is able to interact with itself and with NodD1. The NodD1 ability to interact with itself seems to be weak, at least in the experimental conditions used in this Thesis.

10.- The capacity of the *S. fredii* HH103 *nolR*, *nodD2* or *syrM* mutants to effectively nodulate *Lotus japonicus* Gifu depends on Nod factors production.

BIBLIOGRAFÍA

Abarca-Grau, A.M., Burbank, L.P., de Paz, H.D., Crespo-Rivas, J.C., Marco-Noales, E., López, M.M., Vinardell, J.M., von Bodman, S.B., Panyalver, R. 2012. Role for *Rhizobium rhizogenes* K84 cell envelope polysaccharides in Surface interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:1644-1651.

Abe, I. 2007. Enzymatic synthesis of cyclic triterpenes. *Nat. Prod. Rep.* 24:1311-1321.

Acosta-Jurado, S., Alias-Villegas, C., Navarro-Gómez, P., Almozara, A., Rodríguez-Carvajal, M.A., Medina, C., Vinardell, J.M. 2020. *Sinorhizobium fredii* HH103 *syrM* inactivation affects the expression of a large number of genes, impairs nodulation with soybean, and extends the host-range to the model legume *Lotus japonicus*. *Environ. Microbiol.* 22:1104-1124.

Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Kawaharada, Y., Rodríguez-Carvajal, M.A., Gil-Serrano, A., Soria-Díaz, M.E., Pérez-Montaño, F., Fernández-Perea, J., Yanbo, N., Jiménez-Guerrero, I., Navarro-Gómez, P., López-Baena, F.J., Sandal, N., Stougaard, J., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2019. *Sinorhizobium fredii* HH103 *nolR* and *nodD2* mutants gain capacity for infection thread invasion of *Lotus japonicus* Gifu and *Lotus burttii*. *Environ. Microbiol.* 21(5):1718-1739.

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Crespo-Rivas, J.C., Medina, C., Murdoch, P.S., Cuesta-Berrio, L., Rodríguez-Carvajal, M.A., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2017. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 *rkp-2* region is involved in the biosynthesis of lipopolysaccharide and exopolysaccharide but not in K-antigen polysaccharide production. *Plant Soil.* 417:415-431.

Acosta-Jurado, S., Alias-Villegas, C., Navarro-Gómez, P., Zehner, S., Murdoch, P.D., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soto, M.J., Ollero F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Göttfert, M., Vinardell, J.M. 2016c. The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 global regulator is connected with the *nod* regulon and is required for efficient symbiosis with *Lotus burttii* and *Glycine max* cv. Williams. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29:700-712.

Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, P. del S., Crespo-Rivas, J.C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Vinardell, J.M. 2016b. Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. *PLoS One.* 11:e0160499.

Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Kawaharada, Y., Perea, J.F., Gil Serrano, A., Jin, H., An Q., Rodríguez-Carvajal, M.A., Andersen, S.U., Sandal, N., Stougaard, J., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2016a. *Sinorhizobium fredii* HH103

invades *Lotus burtii* by crack entry in a Nod factor-and surface polysaccharide-dependent manner. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29:925-937.

Adams, M.A., Buchmann, N., Sprent, J.I., Buckley, T.N., Turnbull, T.L. 2018. Crops, nitrogen, water: are legumes friend, foe, or misunderstood ally? *Trends Plant Sci.* 23: 539-550.

Adhya, S., Gottesman, M., Garges, S., Oppenheim, A. 1993. Promoter resurrection by activators- a minireview. *Gene.* 132:1-6.

Aldridge, P. y Hughes, K.T. 2002. Regulation of flagellar assembly. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:160-165.

Almozara García, A. 2019. The *Sinorhizobium fredii* HH103 MdtEC Efflux System is repressed by genistein through a TetR-like regulator. Trabajo Fin de Máster, Máster Genética Molecular y Biotecnología, Universidad de Sevilla.

Anders, S. y Huber, W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 11:R106.

Asakura, S. 1970. Polymerization of flagellin and polymorphism of flagella. *Adv. Biophys.* 1:99-155.

Barnett, M.J. y Long, S.R. 2015. The *Sinorhizobium meliloti* SyrM regulon: effects on global gene expression are mediated by *syrA* and *nodD3*. *J. Bacteriol.* 197:1792-1806.

Barnett, M.J., Swanson, J.A. y Long, S.R. 1998. Multiple genetic controls on *Rhizobium meliloti* *syrA*, a regulator of exopolysaccharide abundance. *Genetics.* 148:19-32.

Barnett, M.J. y Long, S.R. 1997. Identification and characterization of a gene on *Rhizobium meliloti* pSyma, *syrB*, that negatively affects *syrM* expression. *MPMI.* 10:550-559.

Barnett, M.J., Rushing, B.G., Fisher, RF, Long, S.R. 1996. Transcription start sites for *syrM* and *nodD3* flank an insertion sequence relic in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 178:1782-1787.

Becker, A., Overlöper, A., Schlüter, J.P., Reinkensmeier, R., Robledo, M., Giegerich, R., Narberhaus, F., Evguenieva-Hackenberg, E. 2014. Riboregulation in plant-associated alpha-proteobacteria. *RNA Biol.* 11:550-562.

Becker, A. y Pühler, A. Production of exopolysaccharides. 1998. In *The Rhizobiaceae, Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*; Spaink, H.P., Kondorosi, A., Hooykaas, P.J.J., Eds.; Kluwer Academic Publisher: Dordrecht, The Netherlands, pp. 97-108.

Becker, A., Schmidt, M., Jager, W., Puhler, A. 1995c. New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene*. 162:37-39.

Behringer, J.E. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen Microbiol.* 84:188-198.

Belin, B.J., Busset, N., Giraud, E., Molinaro, A., Silipo, A., Newman, D.K. 2018. Hopanoid lipids: from membranes to plant-bacteria interactions. *Nat. Rev. Microbiol.* 16:304-315.

Bennett, J.C., Thomas, J., Fraser, G.M., Hughes, C. 2001. Substrate complexes and domain organization of the *Salmonella* flagellar export chaperones FlgN and FliT. *Mol. Microbiol.* 39:781-791.

Berg, H.C. y Anderson, R.A. 1973. Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature*. 245:380-382.

Bergey's manual of systematics of archaea and bacteria. 2015. Hoboken, New Jersey.

Bonaldi, K., Gargani, D., Prin, Y., Fardoux, J., Gully, D., Nouwen, N., Goormachtig, S., Giraud, E. 2011. Nodulation of *Aeschynomene afraspera* and *A. indica* by photosynthetic *Bradyrhizobium* Sp. strain ORS285: the nod-dependent versus the nod-independent symbiotic interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:1359-1371.

Bradley, A.S., Pearson, A., Sáenz, J.P. y Marx, C.J. 2010. Adenosylhopane: The first intermediate in hopanoid side chain biosynthesis. *Org. Geochem.* 41:1075-1081.

Breedveld, M.W., Canters Cremers, H.C.J., Batley, M., Posthumus, M.A., Zevenhuizen, L.P.T.M., Wijffelman, C.A., Zehnder, A.J.B. 1993. Polysaccharides synthesis in relation to nodulation behaviour of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 175:750-757.

Breedveld, M.W. y Miller, K.J. 1994. Cyclic beta-glucans of members of the family Rhizobiaceae. *Microbiol. Rev.* 58:145-161.

Brenac, L., Baidoo, E.E.K., Keasling, J.D., Budin, I. 2019. Distinct functional roles for hopanoid composition in the chemical tolerance of *Zymomonas mobilis*. *Mol. Microbiol.* 112:1564-1575.

Brown, I.I. y Hase, C.C. 2001. Flagellum independent surface migration of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183:3784-90

Broughton, W.J., Jabbouri, S. y Perret, X. 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* 182:5641-5652.

- Cabañas-Romero, P.V. y Huerta-Saquero, A. 2014. Nanomáquinas biológicas: los sistemas de secreción bacterianos. *Mundo Nano: Revista interdisciplinaria en Nanociencias y Nanotecnología*. Universidad autónoma de México. 7:13.
- Cairns, L.S., Marlow, V.L., Kiley, T.B., Birchall, C., Ostrowski, A., Aldridge, P.D., Stanley-Wall, N.R. 2014. FlgN is required for flagellum-based motility by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 196:2216-26.
- Calatrava Morales, M.N. 2017. 2-Tridecanona como molécula señal en *Sinorhizobium meliloti*: impacto en la nodulación de alfalfa e identificación de las bases moleculares implicadas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada-CSIC.
- 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. *Mol. Plant Microbe Interact.* 30:566-577.
- Calladine, C.R. 1978. Change of wave form in bacterial flagella: The role of mechanics at the molecular level. *J. Mol. Biol.* 118:457-479.
- Campbell, G.R., Reuhs, B.L. y Walker, G.C. 2002. Chronic intracellular infection of alfalfa nodules by *Sinorhizobium meliloti* requires correct lipopolysaccharide core. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:3938-3943.
- Cárdenas, L., Domínguez, J., Santana, O., Quinto, C. 1996. The role of the *nodI* and *nodJ* genes in the transport of Nod metabolites in *Rhizobium etli*. *Gene.* 173:183-7.
- Carlson, R.W., Forsberg, L.S. y Kannenberg, E.L. 2010. Lipopolysaccharides in *Rhizobium*-legume symbioses. *Endotoxins: Structure, Function and Recognition*. Dordrecht. Pp. 339-386. Editores: Wang, W., Quinn, P.J.
- Casida, L.E. Jr. 1982. *Ensifer adhaerens*, gen. nov., sp. nov.: A bacterial predator of bacteria in soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32:339-345.
- Chen, H., Gao, K., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Rolfe, B.G. 2005. Functional genomic analysis of global regulator NolR in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:1340-1352.
- Chen, H., Higgins, J., Kondorosi, E., Kondorosi, A., Djordjevic, M.A., Weinman, J.J., Rolfe, B.G. 2000. Identification of nolR-regulated proteins in *Sinorhizobium meliloti* using proteome analysis. *Electrophoresis.* 21:3823-3832.
- Chen, Y.M., Ho, S.C., Lam, S.S., Ho, S.S., Woo, J.L. 2003. Soy isoflavones have a favourable effect on bone loss in Chinese postmenopausal women with lower bone mass: a double-blind, randomized, controlled trial. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:4740-4747.

Chen, W.X., Yan, G.H. y Li, J.L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 38:392-397.

Chen, X.C., Feng, J., Hou, B.H., Li, F.Q., Li, Q., Hong, G.F. 2005. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. Nucleic Acids Res. 33:2540-2548.

Cheung, J. y Hendrickson, A. 2010. Sensor domains of two-component regulatory systems. Curr. Opin. Microbiol. 13:116-23.

Chevance, F.F. y Hughes, K.T. 2008. Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. Nat. Rev. Microbiol. 6:455-465.

Chevance, F.F., Takahashi, N., Karlinsey, J.E., Gnerer, J., Hirano, T., Samudrala, R., Aizawa, S., Hughes, K.T. 2007. The mechanism of outer membrane penetration by the eubacterial flagellum and implications for spirochete evolution. Genes Dev. 21:2326-2335.

Christianson, D.W. 2006. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. Chem. Rev. 106:3412-3442.

Choma, A., Komaniecka, I. y Zebracki, K. 2017. Structure, biosynthesis and function of unusual lipids A from nodule-inducing and N₂-fixing bacteria. Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Biol. Lipids. 1862:196-209.

Chung, C.T., Niemela, S.L., y Miller, R.H. 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:2172-2175.

Cohen, E.J. y Hughes, K.T. 2014. Rod to hook transition for extracellular flagellum assembly is catalyzed by the L-ring dependent rod scaffold removal. J. Bacteriol. 196:2387-95.

Crespo-Rivas, J.C., Guefrachi, I., Mok, K.C., Villaécija-Aguilar, J.A., Acosta-Jurado, S., Pierre, O., Ruiz-Sainz, J.E., Taga, M.E., Mergaert, P., Vinardell, J.M. 2016. *Sinorhizobium fredii* HH103 bacteroids are not terminally differentiated and show altered O-antigen in nodules of the inverted repeat-lacking clade legume *Glycyrrhiza uralensis*. Environ. Microbiol. 18:2392-2404.

Crespo-Rivas, J.C., Margaret, I., Hidalgo, A., Buendía-Clavería, A.M., Ollero, F.J., López-Baena, F.J., del Socorro Murdoch, P., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soria-Díaz, M.E., Reguera, M., Lloret, J., Sumpton, D.P., Mosely, J.A., Thomas-Oates, J.E., van Brussel, A.A., Gil-Serrano, A., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2009. *Sinorhizobium*

fredii HH103 *cgs* mutants are unable to nodulate determinate- and indeterminate nodule-forming legumes and overproduce an altered EPS. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22:575-588.

D'Antuono, A.L., Casabuono, A., Couto, A., Ugalde, R.A., Lepek, V.C. 2005. Nodule development induced by *Mesorhizobium loti* mutant strains affected in polysaccharide synthesis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:446-457.

D'Haeze, W., John Glushka, J., De Rycke, R., Holsters, M., Carlson, R.W. 2004. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. *Mol. Microbiol.* 52: 485-500.

D'Haeze, W. y Holsters, M. 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology.* 12:79-105.

Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J. 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72: 17-64.

Dangel, A.W., Gibson, J.L., Janssen, A.P. Tabita., F.R. 2005. Residues that influence in vivo and in vitro CbbR function in *Rhodobacter sphaeroides* and identification of a specific region critical for co-inducer recognition. *Mol. Microbiol.* 57:1397-1414.

Dautin, N. y Bernstein, H.D. 2007. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu. Rev. Microbiol.* 61:89-112.

Deakin, W.J. y Broughton, W.J. 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: Rhizobial protein secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:312-320.

de la Mora, J., Ballado, T., González-Pedrajo, B., Camarena, L., Dreyfus, G. 2007. The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 189:7998-8004.

Del Cerro, P., Megías, M., López-Baena, F.J., Gil-Serrano, A., Pérez-Montaña, F., Ollero, F.J. 2019. Osmotic stress activates *nif* and *fix* genes and induces the *Rhizobium tropici* CIAT 899 Nod factor production via NodD2 by up-regulation of the *nodA2* operon and the *nodA3* gene. *PLOS ONE.* 14:e0213298.

Del Cerro, P., Pérez-Montaña, F., Gil-Serrano, A., López-Baena, F.J., Megías, M., Hungria, M., Ollero, F.J. 2017. The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Sci. Rep.* 7:46712.

del Cerro, P., Rolla-Santos, A.A.P., Gomes, D.F., Marks, B.B., Pérez-Montaña, F., Rodríguez-Carvajal, M.A., Nakatani, A.S., Gil-Serrano, A., Megías, M., Ollero, F.J.,

Hungria, M. 2015a. Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. BMC. Genomics 16:251.

de Lyra, M.C.C.P., López-Baena, F.J., Madinabeitia, N., Vinardell, J.M., Espuny, M.R., Cubo, M.T., Bellogín, R.A., Ruiz-Sainz, J.E., Ollero, F.J. 2006. Inactivation of the *Sinorhizobium fredii* HH103 *rhcJ* gene abolishes nodulation outer proteins (Nops) secretion and decreases the symbiotic capacity with soybean. Int. Microbiol. 9:125-133.

Dénarié, J., Debelle, F. y Promé, J.C. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annu. Rev. Biochem. 65:503-35.

Dénarié, J., Debelle, F. y Rosenberg, C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. Annu. Rev. Microbiol. 46:497-531.

Desvaux, M., Hebraud, M., Talon, R., Henderson, I.R. 2009. Secretion and subcellular localizations of bacterial proteins: a semantic awareness issue. Trends Microbiol. 17:139-145.

diCenzo, G.C., Zamani, M., Ludwig, H.N., Finan, T.M. 2017. Heterologous complementation reveals a specialized activity for BacA in the *Medicago-Sinorhizobium meliloti* symbiosis. MPMI. 30:312-324.

Dilanji, G.E., Teplitski, M. y Hagen, S.J. 2014. Entropy-driven motility of *Sinorhizobium meliloti* on a semi-solid surface. Proc. Biol. Sci. 281:20132575.

Doughty, D.A., Coleman, M.L., Hunter, R.C., Sessions, A.L., Summons, R.E., Newman, D.K. 2011. The RND-family transporter, HpnN, is required for hopanoid localization to the outer membrane of *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 108:E1045-51.

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.

Downie, J.A. 1998. Function of rhizobial nodulation genes. The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Dordrecht: Kluwer Acad. Pp. 387-402. Editores; Spaink, H.P., Kondorosi, A. y Hooykaas P.J.J.

Edgren, T y Nordlund, S. 2004. The *fixABCX* genes in *Rhodospirillum rubrum* encode a putative membrane complex participating in electron transfer to nitrogenase. J. Bacteriol. 186:2052-2060.

Erhardt, M., Singer, H.M., Wee, D.H., Keener, J.P., Hughes, K.T. 2011. An infrequent molecular ruler controls flagellar hook length in *Salmonella enterica*. *EMBO J.* 30:2948-2961.

Erhardt, M., Namba, K. y Hughes, K.T. 2010. Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a000299.

Estévez, J., Soria-Díaz, M.E., De Córdoba, F.F., Morón, B., Manyani, H., Gil, A., Thomas-Oates, J., van Brussel, A.A.N., Dardanelli, M.S., Sousa, C., Megías, M. 2009. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na⁺ stress. *FEMS Microbiology Letters.* 293:220-231.

Fabela, S., Domenzain, C., De la Mora, J., Osorio, A., Ramirez-Cabrera, V., Poggio, S., Dreyfus, G., Camarena, L. 2013. A distant homologue of the FlgT protein interacts with MotB and FliL and is essential for flagellar rotation in *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 195:5285-5296.

FAO FAOSTAT. 2018. Disponible online: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

Fellay, R., Hanin, M., Montorzi, G., Frey, J., Freiberg, C., Golinowski, W., Staehelin, C., Broughton, W.J., Jabbouri, S. 1998. *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. *Mol. Microbiol.* 27:1039-1050.

Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E. Gresshoff, P.M. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant. Biol.* 52:61-7.

Fernández-López M., D'Haese, W., Mergaert, P., Verplancke, C., Promé, J.C., Van Montagu, M., Holsters, M. 1996. Role of *nodI* and *nodJ* in lipo-chitooligosaccharide secretion in *Azorhizobium caulinodans* and *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 20:993-1000.

Figurski, D.H. y Helinski, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:1648-1652.

Fischer, W.W., Summons, R.E. y Pearson, A. 2005. Targeted genomic detection of biosynthetic pathways: anaerobic production of hopanoid biomarkers by a common sedimentary microbe. *Geobiology.* 3:33-4.

Fliegmann, J. y Bono, J.J. 2015. Lipo-chitooligosaccharidic nodulation factors and their perception by plant receptors. *Glycoconj. J.* 32:455-64.

Frayse, N., Couderc, F. y Poinso, V. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270:1365-1380.

Freiberg, C., Rémy, F., Bairoch, A., Broughton, W.J., Rosenthal, A., Perret, X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*. 387:394-401.

Fuqua, C., Parsek, M.R. y Greenberg, E.P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* 35:439-68.

Gage, D.J. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68:280-300.

Galán, J.E., Lara-Tejero, M., Marlovits, T.C., Wagner, S. 2014. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 68:415-438.

García-Ramos, M., de la Mora, J., Ballado, T., Camarena, L., Dreyfus, G. 2018. Biochemical and phylogenetic study of SltF, a flagellar lytic transglycosylase from *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 200:e00397-18.

Geiger, O., Röhrs, V., Weissenmayer, B., Finan, T.M., Thomas-Oates, J.E. 2002. The regulator gene *phoB* mediates phosphate stress-controlled synthesis of the membrane lipid diacylglyceryl-N,N,N-trimethylhomoserine in *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti*. *Mol. Biol.* 32:63-73.

Geurts, R. y Bisseling, T. 2002. *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell supplement*. S239-S249.

Gibson, K.E., Kobayashi, H. y Walker, G.C. 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.* 42:413-41.

Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, L., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J.C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W.L., Chang, W.S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Verméglie, A., Médigue, C., Sadowsky, M. 2007. Legumes Symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*. 361:1307-1312.

Glazebrook, J., Ichige, A. y Walker, G.C. 1993. A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes Dev.* 7:1485-1497.

Glew, M.D., Veith, P.D., Peng, B., Chen, Y., Gorasia, D.G., Yang, Q., Slakeski, N., Chen, D., Moore, C., Crawford, S., Reynolds, E.C. 2012. PG0026 is the C-terminal signal

peptidase of a novel secretion system of *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. 287: 24605-24617.

González-Bernal, M.J. y Rubiales, D. 2016. Las leguminosas grano en la agricultura española y europea. Arbor, 192 (779):a311.

González-Pedrajo, B., de la Mora, J., Ballado, T., Camarena, L., Dreyfus, G. 2002. Characterization of the *flgG* operon of *Rhodobacter sphaeroides* WS8 and its role in flagellum biosynthesis. Biochim. Biophys. Acta. 1579:55-63.

Goormachtig, S., Capoen, W. y Holsters, M. 2004. *Rhizobium* infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. Trends Plant Sci. 9:518-522.

Göttfert, M., Rothlisberger, S., Kundig, C., Beck, C., Marty, R., Hennecke, H. 2001. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. J. Bacteriol. 183:1405-1412.

Göttfert, M., Horvath, B., Kondorosi, E., Putnoky, P., Rodriguez-Quiñones, F., Kondorosi, A. 1986. At least two *nodD* genes are necessary for efficient nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. J. Mol. Biol. 191:411-20.

Griffitts, J.S. y Long, S.R. 2008. A symbiotic mutant of *Sinorhizobium meliloti* reveals a novel genetic pathway involving succinoglycan biosynthetic functions. Mol. Microbiol. 67:1292-1036.

Guasch-Vidal, B., Estévez, J., Dardanelli, M.S., Soria-Díaz, M.E., de Córdoba, F.F., Balog, C.I. Manyani, H., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Hensbergen, P.J., Deelder, A.M., Megías, M., van Brussel, A.A. 2013. High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers. Mol. Plant Microbe Interact, 26: 451-460.

Guefrachi, I., Pierre, O., Timchenko, T., Alunni, B., Barriere, Q., Czernic, P., Villaécija-Aguilar, J.A., Verly, C., Bourge, M., Fardoux, J., Mars, M., Kondorosi, E., Giraud, E., Mergaert, P. 2015. *Bradyrhizobium* BclA is a peptide transporter required for bacterial differentiation in symbiosis with *Aeschynomene* legumes. Mol. Plant Microbe Interact. 28:1155-66.

Guidolin, L.S., Arce-Gorvel, V., Ciocchini, A.E., Comerci, D.J., Gorvel, J.P. 2018. Cyclic β -glucans at the bacteria-host cells interphase: One sugar ring to rule them all. Cell Microbiol. 20: e12850.

Gyaneshwar, P., Hirsch, A.M., Moulin, L., Chen, W.M., Elliott, G.N., Bontemps, C., Estrada-de Los Santos, P., Gross, E., Bueno Dos Reis, F., Sprent, J.I., Young, J.P.W.,

James, E.K. 2011. Legume-nodulating Betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Mol. Plant Microbe Interact.* 24:1276-88.

Gyorgypal, Z., Iyer, N. y Kondorosi, A. 1988. Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Mol. Gen. Genet.* 212:85-92.

Haag, A.F., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Sani, M., Longhi, R., Baloban, M., Wilson, H.M., Mergaert, P., Zanda, M., Ferguson, G.P. 2012. Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodule-specific, cysteine-rich peptide. *J. Biol. Chem.* 287:10791-8.

Haag, A.F., Baloban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., Longhi, R., Boncompagni, E., Hérouart, D., Dall'angelo, D., Kondorosi, E., Zanda, M., Mergaert, P., Ferguson, G.P. 2011a. Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biol* 9: e1001169.

Hanin, M., Jabbouri, S., Broughton, W.J., Fellay, R. 1998. SyrM1 of *Rhizobium* sp. NGR234 activates transcription of symbiotic loci and controls the level of sulfated Nod factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:343-350.

Hanin, M., Jabbouri, S., Quesada-Vincens, D., Freiberg, C., Perret, X., Prome, J.C., Broughton, W.J., Fellay, R. 1997. Sulphation of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors is dependent on *noeE*, a new host-specificity gene. *Mol. Microbiol.* 24:1119-1129.

Harshey, R.M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:249-73.

Harshey, R.M. 1994. Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* 13:389-94.

Hassan, S. y Mathesius, U. 2012. The role of flavonoids in root rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J. Exp. Bot.* 63:3429-3444.

Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M., Wallace, J.C. 1988. A large family of bacterial activator proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 85:6602-6.

Henrichsen, J. 1972. Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol. Rev.* 36:478-503.

Herlihey, F.A., Moynihan, P.J. y Clarke, A.J. 2014. The essential protein for bacterial flagella formation FlgJ functions as a β -N-acetylglucosaminidase. *J. Biol. Chem.* 289:31029-42.

Herridge, D.F., Peoples, M.B. y Boddey, R.M. 2008. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. *Plant Soil*. 311:1-18.

Herridge, D.F. y Rose, I.A. 2000. Breeding for enhanced nitrogen fixation in crop legumes. *Field Crops Res.* 65:229-248.

Hirano, T., Yamaguchi, S., Oosawa, K., Aizawa, S. I. 1994. Roles of FliK and FlhB in determination of flagellar hook length in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176: 5439-5449.

Holland, I.B y Blight, M.A. 1999. ABC-ATPases, adaptable energy generators fuelling transmembrane movement of a variety of molecules in organisms from bacteria to humans. *Journal of molecular biology.* 293:381-99.

Homma, M., Kutsukake, K., Hasebe, M., Iino, T., Macnab, R.M. 1990. FlgB, FlgC, FlgF and FlgG. A family of structurally related proteins in the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 211:465-477.

Homma, M.A. y Ausubel, F.M. 1987. *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA.* 84:8558-8562.

Homma, M. y Iino, T. 1985. Locations of hook-associated proteins in flagellar structures of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 162:183-189.

Hong, H.J., Kim, T.H., Song, W.S., Ko, H.J., Lee, G.S., Kang, S.G., Kim, P.H., Yoon, S.Y. 2018. Crystal structure of FlgL and its implications for flagellar assembly. *Sci. Rep.* 8:14307.

Hryniewicz, M. M. y Kredich, N.M. 1994. Stoichiometry of binding of CysB to the *cysJIIH*, *cysK*, and *cysP* promoter regions of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 176:3673-3682.

Ibáñez, F., Wall, L. y Fabra, A. 2017. Starting points in Plant-Bacteria nitrogen-fixing symbioses: intercellular invasion of the roots. *J. Exp. Bot.* 68:1905-1918.

Ikeda, T., Asakura, S. y Kamiya, R. 1985. “Cap” on the tip of *Salmonella* flagella. *J. Mol. Biol.* 184:735-737.

Inayama, S., Hori, H. y Pang, G.M. 1989. Isolation of a hopane-type triterpenoid, zeorin, from a higher plant, *Tripterygium regelii*. *Chem. Pharm. Bull.* 37:2836-2837.

Jacob, C., Carrasco, B. y Schwember, A.R. 2016. Advances in breeding and biotechnology of legume crops. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 127:561-584.

Janczarek, M., Rachwal, K., Marzec, A., Grzadziel, J. 2015. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-*rhizobium* interactions. *Appl. Soil Ecol.* 85:94-113.

Janczarek, M. 2011. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int. J. Mol. Sci.* 12:7898-7933.

Jiménez-Guerrero, I., Acosta-Jurado, S., Del Cerro, P., Navarro-Gómez, P., López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Vinardell, J.M., Pérez-Montaña, F. 2017. Transcriptomic studies of the effect of Nod gene-inducing molecules in rhizobia: different weapons, one purpose. *Genes.* 21;9:1.

Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaña, F., Monreal, J.A., Preston, G.M., Fones, H., Vioque, B., Ollero, F.J., López-Baena, F.J. 2015. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 type 3 secretion system suppresses early defense responses to effectively nodulate soybean. *Molecular Plant Microbe Interactions.* 28:790-799.

Jones, C.J., Macnab, R.M., Okino, H., Aizawa, S. 1990b. Stoichiometric analysis of the flagellar hook-(basal-body) complex of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 212:377-387.

Jones, C.J. y Macnab, R.M. 1990a. Flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*: analysis with temperature-sensitive mutants. *J. Bacteriol.* 172:1327-1339.

Jones, J.D. y Dangel, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature.* 444:323-329.

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.

Jones, P.M. y George, A.M. 2013. Mechanism of the ABC transporter ATPase domains: catalytic models and the biochemical and biophysical record. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48:39-50.

Kahn, M.L., McDermott, T.R. y Udvardi, M.K. 1998. Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria.* Dordrecht: Kluwer Acad. Pp. 417-429. Editores; Spaink, H.P., Kondorosi, A. y Hooykaas P.J.J.

Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. y Tabata, S. 2000. Complete

genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. DNA Res. 7:331-338.

Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M.W., Hjuler, C.T., Gysel, K., Muszynski, A., Carlson, R.W., Thygesen, M.B., Sandal, N., Asmussen, M.H., Vinther, M., Andersen, S.U., Krusell, L., Thirup, S., Jensen, K.J., Ronson, C.W., Blaise, M., Radutoiu, S., Stougaard, J. 2015. Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. Nature. 523:308-312.

Kawaharada, Y., Kiyota, H., Eda, S., Minamisawa, K., Mitsui, H. 2010. Identification of the *Mesorhizobium loti* gene responsible for glycerophosphorylation of periplasmic cyclic beta-1,2-glucans. FEMS Microbiol. Lett. 302:131-7.

Kearns, D. B. 2010. A field guide to bacterial swarming motility. Nat. Rev. Micro. 8: 634-644

Kelly, S., Sullivan, J. T., Kawaharada, Y., Radutoiu, S., Ronson, C. W., Stougaard, J. 2018. Regulation of Nod factor biosynthesis by alternative NodD proteins at distinct stages of symbiosis provides additional compatibility scrutiny. Env. Microbiol. 20:97-110.

Kelly, S., Radutoiu, S. y Stougaard, J. 2017. Legume LysM receptors mediate symbiotic and pathogenic signalling. Curr. Opin. Plant Biol. 39:152-158.

Kelly, S.J., Muszynski, A., Kawaharada, Y., Hubber, A.M., Sullivan, J.T., Sandal, N., Carlson, R.W., Stougaard, J., Ronson, C.W., 2013. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. Mol. Plant Microbe Interact. 26:319–329.

Kenney L.J. 2010. How important is the phosphatase activity of sensor kinases? Curr. Opin. Microbiol. 13:168-76.

Kittelberger, R. y Hilbink, F. 1993. Sensitive silver-staining detection of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. J. Biochem. Biophys. Methods. 26:81-6.

Kiss, E., Mergaert, P., Oláh, B., Kereszt, A., Staehelin, C., Davies, A.E., Downie, J.A., Kondorosi, A., Kondorosi, E. 1998. Conservation of *nolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the *Rhizobiaceae* family. Mol. Plant-Microbe. Interact. 11:1186-1195.

Kobayashi, H y Broughton, W.J. 2008. Fine-tuning of symbiotic genes in rhizobia: flavonoid signal transduction cascade, p 117–152. In Dilworth, J., James, E.K., Sprent, J.I., Newton, W.E. (ed), Nitrogen-fixing leguminous symbioses, vol 7. Springer Science Business Media, Berlin, Germany.

Kobayashi, H., Graven, Y. N., Broughton, W.J., Perret, X. 2004. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod-box* controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* 51:335-347.

Kobayashi, K., Saitoh, T., Shah, D.S., Ohnishi, K., Goodfellow, I.G., Sockett, R.E., Aizawa, S.I. 2003. Purification and characterization of the flagellar basal body of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 185:5295-5300.

Kondorosi, E., Mergaert, P. y Kereszt, A. 2013. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu. Rev. Microbiol.* 67:611-28.

Kondorosi, E. y Kondorosi, A. 2004. Endoreduplication and activation of the anaphasepromoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett.* 567:152-157.

Kondorosi, E., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Buire, M., Hoffmann, B., Schell, J., Kondorosi, A. 1991. Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* 222:885-896.

Kondorosi, E., Gyuris, J., Schmidt, J., John, M., Duda, E., Hoffmann, B., Schell, J., Kondorosi, A. 1989. Positive and negative control of *nod* gene expression in *Rhizobium meliloti* is required for optimal nodulation. *EMBO J.* 8:1331-1340.

Krishnan, H.B., Lorio, J., Kim, W.S., Jiang, G., Kim, K.Y., DeBoer, M., Pueppke, S.G. 2003. Extracellular proteins involved in soybean cultivar specific nodulation are associated with pilus-like appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16:617-625.

Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K., Aizawa, S. 1992. Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Biol.* 226:433-446.

Kulkarni, G., Busset, N., Molinaro, A., Gargani, D., Chaintreuil, C., Silipo, A., Giraud, E., Newman, D.K. 2015. Specific hopanoid classes differentially affect free-living and symbiotic states of *Bradyrhizobium diazoefficiens*. *mBio.* 6:1-9.

Kullik, I., M. B. Toledano, L. A. Tartaglia, G., Storz. 1995. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation. *J. Bacteriol.* 177:1275-1284.

Kutsukakea, K., Okada, T., Yokoseki, T., Tetsuo, Inob. 1994. Sequence analysis of the *flgA* gene and its adjacent region in *Salmonella typhimurium*, and identification of another flagellar gene, *flgN*. *Gene.* 143:49-54.

Lamrabet, Y., Bellogín, R.A., Cubo, T., Espuny, M.R., Gil-Serrano, A., Krishnan, H.B., Megías, M., Ollero, F.J., Pueppke, S.G., Ruiz-Sainz, J.E., Spaink, H.P., Tejero-Mateo, P., Thomas-Oates, J., Vinardell, J.M. 1999. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:207-217.

Lee, S.G., Krishnan, H.B. y Jez J.M. 2014. Structural basis for regulation of rhizobial nodulation and symbiosis gene expression by the regulatory protein NolR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:6509-6514.

Lee, V.T. y Schneewind, O. 2001, Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Develop.* 15:1725-1752.

Lemaire, B., Chimphango, S.B., Stirton, C., Rafudeen, S., Honnay, O., Smets, E., Chen, W.M., Sprent, J., James, E.K., Muasya, A.M. 2016. Biogeographical patterns of legume-nodulating *Burkholderia* spp.: from African Fynbos to continental scales. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:5099-5115.

Le Quéré, A.J.L., Deakin, W.K., Schmeisser, C., Carlson, R.W., Streit, W.R., Broughton, W.J., Scott Forsberg, L. 2006. Structural characterization of a K-antigen capsular polysaccharide essential for normal symbiotic infection in *Rhizobium* sp. NGR234. *J. Biol. Chem.* 281:28981-28992.

Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J.C., Dénarié, J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature.* 344:781-784.

Li, F., Hou, B., y Hong, G. Symbiotic plasmid is required for NolR to fully repress nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* A34. 2008. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40:901-7.

Liu, Y., Jiang, X., Guan, D., Zhou, W., Ma, M., Zhao, B., Cao, F., Li, L., Li, J. 2017. Transcriptional analysis of genes involved in competitive nodulation in *Bradyrhizobium diazoefficiens* at the presence of soybean root exudates. *Sci. Rep.* 7:10946.

Locher, K.P. 2016. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23:487-93.

Long, S.R. y Ehrhardt, D.W. 1989. New route to a sticky subject. *Nature.* 338: 545-546.

López-Baena, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Vinardell, J.M. 2016. Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.* 17, E755.

López-Baena, F.J., Vinardell, J.M., Pérez-Montaña, F., Crespo-Rivas, J.C., Bellogín, R.A., Espuny, M del R., Ollero, F.J. 2008. Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiol.* 154:1825-1836.

McConkey, A.T. 1900. Note on a new medium for the growth and differentiation of the *Bacillus coli* communis and the *Bacillus typhi abdominalis*. *The Lancet*, Part II:20.

Machado, D., Pueppke, S.G., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E., Krishnan, H.B. 1998. Expression of *nodD1* and *nodD2* in *Sinorhizobium fredii*, a nitrogen-fixing symbiont of soybean and other legumes. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 11:375-382.

Macnab, R.M. 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu. Rev. Microbiol.* 57:77-100.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A. Brock, T. 2015. *Brock Biology of Microorganisms*. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall. pp. 514.

Madigan, M.T., Martinko, J.M. y Parker, J. 2004. *Brock: Biología de los microorganismos*. 10ª ed. Pearson Educación S.A., Madrid (España).

Madinabeitia, N., Bellogín, R.A., Buendía-Clavería, A.M., Camacho, M., Cubo, T., Espuny, M.R., Gil-Serrano, A., de Lyra, M.C.C.P., Moussaid, A., Ollero, F.J., Soria-Díaz, M.E., Vinardell, J.M., Zeng, J., Ruiz-Sainz, J.E. 2002. *Sinorhizobium fredii* HH103 has a truncated *nolO* gene due to a -1 frameshift mutation that is conserved among other geographically distant *S. fredii* strains. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 150-159.

Madsen, L.N., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J.T., Heckmann, A.B., Bek, A.S., Ronson, C.W., James, E.K., Stougaard, J. 2010. The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat. Commun.* 1:10.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).

Margaret, I., Lucas, M., Acosta-Jurado, S., Buendía-Clavería, A.M., Fedorova, E., Hidalgo, A., Rodríguez-Carvajal, M.A., Rodríguez-Navarro, D.N., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2013. The *Sinorhizobium fredii* HH103 lipopolysaccharide is not only relevant at early soybean nodulation stages but also for symbiosome stability in mature nodules. *PLoS ONE*. 8: e74717.

Margaret, I., Becker, A., Blom, J., Bonilla, I., Goesmann, A., Göttfert, M., Lloret, J., Mittard-Runte, V., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M., Weidner, S. 2011. Symbiotic

properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J. Biotechnol.* 155:11-19.

Marie, C., Broughton, W.J. y Deakin, W.J. 2001. *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:336-342.

Marsh, J.F., Rakocevic, A., Mitra, R.M., Brocard, L., Sun, J., Eschstruth, A., Long, S.R., Schultze, M., Ratet, P., Oldroyd, F.E.D. 2007. *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin dependent protein kinase. *Plant Physiol.* 144:324-335.

Martens, M., Delaere, M., Coopman, R., de Vos, P., Gillis, M., Willems, A. 2007. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:489-503.

Matsuyama, T., Bhasin, A. y Harshey, R.M. 1995. Mutational analysis of flagellum independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low-agar medium. *J. Bacteriol.* 177:987-91.

Mattick, J.S. 2002. Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:289-314.

McCarter, L.L. 2001. Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65:445-462.

Mengucci, F., Dardis, C., Mongiardini, E.J., Althabegoiti, M.J., Partridge, J.D., Kojima, S., Homma, M., Quelas, J.I., Lodeiro, A.R. 2019. Characterization of FliL proteins in *Bradyrhizobium diazoefficiens*: lateral FliL supports swimming motility, and subpolar FliL modulates the lateral flagella system. *J. Bacteriol.* PMID: 31843800.

Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A., Kondorosi, E. 2003. A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiol.* 132:161-73.

Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Mimori, Y., Yamashita, I., Murata, K., Fujiyoshi, Y., Yonekura, K., Toyoshima, C., and Namba, K. 1995. The structure of the R-type straight flagellar filament of *Salmonella* at 9 angstrom resolution by electron cryomicroscopy. *J. Mol. Biol.* 249:69-87.

Minamino, T. 2018. Hierarchical protein export mechanism of the bacterial flagellar type III protein export apparatus. *FEMS Microbiol. Lett.* 365, fny117.

Minamino, T. e Imada, K. 2015. The bacterial flagellar motor and its structural diversity. *Trends Microbiol.* 23:267-274.

Minamino, T., Moriya, N., Hirano, T., Hughes, K.T., Namba, K. 2009. Interaction of FliK with the bacterial flagellar hook is required for efficient export specificity switching. *Mol. Microbiol.* 74:239-251.

Minamino, T., Imada, K. y Namba, K. 2008. Molecular motors of the bacterial flagella. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18:693-701.

Minamino, T., Ferris, H.U., Moriya, N., Kihara, M., Namba, K. 2006. Two parts of the T3S4 domain of the hook-length control protein FliK are essential for the substrate specificity switching of the flagellar type III export apparatus. *J. Mol. Biol.* 362:1148-1158.

Minamino, T. y Namba, K. 2004. Self-assembly and type III protein export of the bacterial flagellum. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7:5-17.

Montiel, J., Downie, J.A., Farkas, A., Bihari, P., Herczeg, R., Bálint, B., Mergaert, P., Kereszt, A., Kondorosi, É. 2017. Morphotype of bacteroids in different legumes correlates with the number and type of symbiotic NCR peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 114:5041-5046.

Montiel, J., Szűcs, A., Boboescu, I.Z., Gherman, V.D., Kondorosi, E., Kereszt, A. 2016. Terminal bacteroid differentiation is associated with variable morphological changes in legume species belonging to the inverted repeat-lacking clade. *APS.* 29:210-219.

Morgan, D.G., Owen, C., Melanson, L. A Derosier, D.J. 1995. Structure of bacterial flagellar filaments at 11 angstrom resolution: Packing of the alpha-helices. *J. Mol. Biol.* 249:88-110.

Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1989. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Genetics.* 122:7-18.

Nakamura, S. y Minamino, T. 2019. Flagella-driven motility of bacteria. *Biomol.* 9:279.

Nambu, T., Inagaki, Y y Kutsukake, K. 2006. Plasticity of the domain structure in FlgJ, a bacterial protein involved in flagellar rod formation. *Genes Genet. Syst.* 81:381-389.

Nelson, M.S. y Sadowsky, M.J. 2015. Secretion systems and signal Exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Front. Plant Sci.* 6:491.

O'Toole, G.A. y Kolter, R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28: 449–461.

Oke, V., y Long, S.R. 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Mol. Microbiol.* 32: 837–849.

Oldroyd, G. 2013. Speak, friend, and enter: Signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature.* 11:252-263.

Oliveira, L.R., Rodrigues, E.P., Marcelino-Guimarães, F.C., Oliveira, A.L., Hungria, M. 2013. Fast induction of biosynthetic polysaccharide genes *lpxA*, *lpxE*, and *rkpI* of *Rhizobium* sp. strain PRF 81 by common bean seed exudates is indicative of a key role in symbiosis. *Funct. Integr. Genom.* 13:275-283.

Olsthoorn, M.M., López-Lara, I.M., Petersen, B.O., Bock, K., Haverkamp, J., Spaink, H.P., Thomas-Oates, J.E. 1998. Novel branched Nod factor structure results from alpha-(1-3) fucosyl transferase activity: the major lipo-chitin oligosaccharides from *Mesorhizobium loti* strain NZP2213 bear an alpha-(1-3) fucosyl substituent on a nonterminal backbone residue. *Biochemistry.* 37:9024-32.

Ormeño-Orrillo, E., Gomes, D.F., del Cerro, P., Vasconcelos, A.T.R., Canchaya, C., Almeida, L.G.P., Mercante, F.M., Ollero, F.J., Megías, M., Hungria, M. 2016. Genome of *Rhizobium leucaenae* strains CFN 299 T and CPAO 29.8: searching for genes related to a successful symbiotic performance under stressful conditions. *BMC Genomics.* 17:534.

Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Gonzaga, L.A., Ollero, F.J., Nicolas, M.F., Rodrigues, E.P., Shigueyoshi, N.A., Silva Batista, J.S., Oliveira Chueire, L.M., Souza, R.C., Ribeiro Vasconcelos, A.T, Megías, M., Hungria, M., Martínez-Romero, E. 2012. Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *rhizobium tropici* CIAT 899 and *rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC, Genomics.* 13:735.

Ourisson, G., Albrecht, P. y Rohmer, M. 1979. The hopanoids: palaeochemistry and biochemistry of a group of natural products. *Pure Appl. Chem.* 51:709-729.

Pallen, M.J., Beatson, S. y Bailey, C. 2005. Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:201-29.

Pallen, M.J., Chaudhuri, R.R. y Henderson, I.R. 2003. Genomic analysis of secretion systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:519-527.

Parniske, M. y Downie, J.A. 2003. Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature*. 425:569-570.

Parsek, M.R., Kivisaar, M. y Chakrabarty A.M. 1995. Differential DNA bending introduced by the *Pseudomonas putida* LysR-type regulator, CatR at the plasmid-borne *pheBA* and chromosomal *catBC* promoters. *Mol. Microbiol.* 15:819-828.

Patriarca, E.J., Tatè, R., Ferraioli, S. y Iaccarino, M. 2004. Organogenesis of the legume root nodules. *Int. Rev. Citol.* 234:201-262.

Peck, M.C., Fisher, R.F. y Long, S.R. 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 188:5417-5427.

Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Ollero, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M. 2016b. A transcriptomic analysis of the effect of flavonoids on *Sinorhizobium fredii* HH103 reveals novel rhizobial genes putatively involved in symbiosis. *Sci. Rep.* 6:31592.

Perret, X., Staehelin, C. y Broughton, W.J. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:180-201.

Perzl, M., Reipen, I.G., Schmitz, S., Poralla, K., Sahm, H., Sprenger, G.A., Kannenberg, E.L. 1998. Cloning of conserved genes from *Zymomonas mobilis* and *Bradyrhizobium japonicum* that function in the biosynthesis of hopanoid lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1393:108-118.

Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. 2002c. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 30:e36.

Poole, P., Ramachandran, V y Terpolilli, J. 2018. Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 16:291-303.

Poolman, B., Spitzer, J.J y Wood, J.M. 2004. Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta.* 1666: 88-104.

Pueppke, S.G. y Broughton, W.J. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 y *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:293-318.

Racolta, S., Juhl, P.B., Sirim, D. y Pleiss, J. 2012. The triterpene cyclase protein family: a systematic analysis. *Proteins.* 80:2009-2019.

Recht, J., Martinez, A., Torello, S., Kolter, R. 2000. Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* 182:4348-51.

- Rees, D.C., Johnson, E y Lewinson, O. 2009. ABC transporters: the power to change. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:218-227.
- Rego, A., Chandran, V. y Waksman, G. 2010. Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochem. J.* 425:475-488.
- Reuhs, B.L., Geller, D.P., Kim, S., Fox, J.F., Kolli, V.S.K., Pueppke, S.G., 1998. *Sinorhizobium fredii* and *Sinorhizobium meliloti* produce structurally conserved lipopolysaccharides and strain-specific K antigens. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:4930-4938.
- Reuhs, B.L., Carlson, R.W., Kim, J.S. 1993. *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:3570-3580.
- Rhee, K.Y., Senear, D.F. y Hatfield, G.W. 1998. Activation of gene expression by a ligand-induced conformational change of a protein-DNA complex. *J. Biol. Chem.* 273:11257-11266.
- Rice, P., Longden, I. y Bleasby, A. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet.* 16:276-7.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J. y Smyth, G.K. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 26:139-140.
- Rodpothong, P., Sullivan, J.T., Songsrirote, K., Sumpton, D., Cheung, K.W., Thomas-Oates, J., Radutoiu, S., Stougaard, J., Ronson, C.W. 2009. Nodulation gene mutants of *Mesorhizobium loti* R7A-*nodZ* and *nolL* mutants have host-specific phenotypes on *Lotus* spp. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22:1546-1554.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Rodríguez-Carvajal, M.A., Acosta-Jurado, S., Soto, M.J., Margaret, I., Crespo-Rivas, J.C., Sanjuan, J., Temprano, F., Gil-Serrano, A., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2014. Structure and biological roles of *Sinorhizobium fredii* HH103 exopolysaccharide. *PLoS One.* 9(12):e115391.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Margaret-Oliver, I., Albareda-Contreras, M., Ruiz-Sainz, J.E. 2011. Soybean interactions with soil microbes, agronomical and molecular aspects. *Agronomy Sust. Developm.* 31:173.
- Rodríguez-Navarro, D.N., Dardanelli, M.S., Ruiz-Sainz, J.E. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 272:127-136.

Rodriguez-Quinones, F., Banfalvi, Z., Murphy, P., Kondorosi, A. 1987. Interspecies homology of nodulation genes in *Rhizobium*. *Plant Mol. Biol.* 8:61-75.

Rohmer, M., Anding, C. y Ourisson, G. 1980. Non-specific biosynthesis of hopane triterpenes by a cell-free system from *Acetobacter pasteurianum*. *Eur. J. Biochem.* 112:541-547.

Ruiz-Sainz, J.E., Zhou, J.C., Rodriguez-Navarro, D.N., Vinardell, J.M., ThomasOates, J.E. 2005. Soybean cultivation and BNF in China. In *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry, Ecology, and the Environment*, ed. Werner, D. and Newton, W.E. Dordrecht, The Netherlands. Springer, pp. 67-87.

Saiki, R.K. 1990. Amplification of genomic DNA. En *PCR Protocols. A guide of methods and applications*, Editores: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. Academic Press Inc., (EEUU). pp. 13-20.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).

Sandal, N., Jin, H., Rodríguez-Navarro, D.N., Temprano, F., Cvitanich, C., Brachmann, A., Sato, S., Kawaguchi, M., Tabata, S., Parniske, M., Ruiz-Sainz, J.E., Andersen, S.U., Stougaard, J. 2012. A set of *Lotus japonicus* Gifu x *L. burtii* recombinant inbred lines facilitates map-based cloning and QTL mapping. *DNA Res.* 19:317-323.

Sawada, H., Kuykendall L.D. y Young J.M. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen Appl. Microbiol.* 49:155-79.

Schäfer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Puhler, A. 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene.* 145:69-73.

Scharf, B., Schuster-Wolff-Bühring, 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.* 183:5334-5342.

Schell, M.A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:595-626.

Schlaman, H.R.M., Phillips, D.A., Kondorosi, E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. *The Rhizobiaceae: Molecular*

Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Dordrecht: Kluwer Acad. Pp. 361-386. Editores; Spaink, H.P., Kondorosi, A. y Hooykaas P.J.J.

Silipo, A., Vitiello, G., Gully, D., Sturiale, L., Chaintreuil, C., Fardoux, J., Gargani, D., Lee, H.I., Kulkarni, G., Busset, N., Marchetti, R., Palmigiano, A., Moll, H., Engel, R., Lanzetta, R., Paduano, L., Parrilli, M., Chang, W.S., Holst, O., Newman, D.K., Garozzo, D., D'Errico, G., Giraud, E., Molinaro, A. 2014. Covalently linked hopanoid-lipid A improves outer-membrane resistance of a *Bradyrhizobium* symbiont of legumes. *Nat. Commun.* 5:5106.

Simon, R., Priefer, U. y Puhler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic-engineering-transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio-Technol.* 1:784-791.

Soto, M.J., Sanjuán, J. y Olivares, J. 2006. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology.* 152:3167-3174.

Sourjik, V. y Schmitt, R. 1996. Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* 22:427-436.

Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.

Spöring, I., Martinez, V.A., Hotz, C., Schwarz-Linek, J., Grady, K.L., Nava-Sedeño, J.M., Vissers, T., Singer, H.M., Rohde, M., Bourquin, C., Hatzikirou, H., Poon, W.C.K., Dufour, Y.S., Erhardt, M. 2018. Hook length of the bacterial flagellum is optimized for maximal stability of the flagellar bundle. *PLoS Biol.*, 16:e2006989.

Sprent, J.I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.* 174:11-25.

Spaink, H.P. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:257-288.

Spaink, H.P., Kondorosi, A. y Hooykaas, P.J.J. 1998. The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria. Dordrecht: Kluwer Acad. 566 pp.

Spaink, H.P., Wijffjes, A.H.M. y Lugtenberg, B.J.J. 1995. *Rhizobium* NodI and NodJ play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligo-saccharides. *J. Bacteriol.* 177: 6279-6281.

Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Pees, E., Okker, R.J.H., Lugtenberg, B.J.J. 1987a. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature.* 328:337-40.

Stacey, G. 1991. A lipopolysaccharide mutant of *Bradyrhizobium japonicum* that uncouples plant from bacterial differentiation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4:332.

Stock, A.M., Robinson, V.L. y Goudreau, P.N. 2000. Two-component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 69:183-215.

Sugawara, M. y Sadowsky, M.J. 2014. Enhanced nodulation and nodule development by *nolR* mutants of *Sinorhizobium medicae* on specific *Medicago* host genotypes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 27:328-335.

Sugiyama, A. 2019. The soybean rhizosphere: Metabolites, microbes and, beyond-A review. *J. Adv. Research.* 19:67-73.

Suzaki T., Yoro, E. y Kawaguchi, M. 2015. Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 316:111-58.

Swanson, J.A., Mulligan, J.T. y Long, S.R. 1993. Regulation of *syrM* and *nodD3* in *Rhizobium meliloti*. *Genetics.* 134:435-444.

Sy, A., Giraud, E., Jourand, P., Garcia, N., Willems, A., de Lajudie, P., Prin, Y., Neyra, M., Gillis, M., Boivin-Masson, C., Dreyfus, B. 2001. Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodule and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183:214-220.

Takekawa, N., Isumi, M., Terashima, H., Zhu, S., Nishino, Y., Sakuma, M., Kojima, S., Homma, M., Imada, K. 2019. Structure of *Vibrio* FliL, a new stomatin-like protein that assists the bacterial flagellar motor function. *mBio.* 10: e00292-1.

Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S., Sasakawa, C. 2000. Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J.* 19:3876-87.

Tambalo, D.D., Bustard, D.E., Del Bel, K.L., Koval, S.F., Khan, M.F., Hynes, M.F. 2010. Characterization and functional analysis of seven flagellin genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. Characterization of *R. leguminosarum* flagellins. *BMC Microbiol.* 10:219.

Tampakaki, A.P. 2014. Commonalities and differences of T3SSs in rhizobia and plant pathogenic bacteria. *Front. Plant Sci.* 5:114.

Temprano-Vera, F., Rodríguez-Navarro, D.N., Acosta-Jurado, S., Perret, X., Fossou, R.K., Navarro-Gómez, P., Zhen, T., Yu, D., An, Q., Buendía-Clavería, A.M., Moreno, J., López-Baena, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2018. *Sinorhizobium fredii* strains HH103 and NGR234 form nitrogen fixing nodules with diverse wild soybeans (*Glycine*

soja) from central China but are ineffective on northern China accessions. *Front. Microbiol.* 9:2843.

ter Beek, J., Guskov, A. y Slotboom, D.J. 2014. Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of general physiology.* 143:419-35.

Terashima, H., Kawamoto, A., Morimoto, Y.V., Imada, K., Minamino, T. 2017. Structural differences in the bacterial flagellar motor among bacterial species. *Biophys. Physicobiology.*14:191-198.

Terashima, H., Kojima, S. y Homma, M. 2008. Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Int. Rev. Cell. Biol.* 270:39-85.

Terpolilli, J.J., Hood, G.A., y Poole, P.S. 2012. What determines the efficiency of N (2)-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Adv. Microb. Physiol.* 60:325-389.

Theunis, M., Kobayashi, H., Broughton, W.J., Prinsen, E. 2004. Flavonoids, NodD1, NodD2, and *nod box* NB15 modulate expression of the *y4wEFG* locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:1153-1161.

Thomas, D.R., Francis, N.R., Xu, C., DeRosier, D.J. 2006. The three-dimensional structure of the flagellar rotor from a clockwise-locked mutant of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 188:7039-7048.

Toledano, M., Kullik, I., Trinh, F., Baird, P., Schneider, T., Storz, G. 1994. Redox dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: A mechanism for differential promoter selection. *Cell.* 78:897-909.

Tomii, K. y Kanehisa, M. 1998. A comparative analysis of ABC transporters in complete microbial genomes. *Genome research.* 8:1048-59.

Torres Tejerizo, G., Lozano, L., González, V., Bustos, P., Romero, D., Brom, S. 2012. Draft genome sequence of the bean-nodulating *Sinorhizobium fredii* strain GR64. *J. Bacteriol.* 194: 6978.

Townsend, G.E., Forsberg, L.S. y Keating, D.H. 2006. *Mesorhizobium loti* produces *nodPQ*-dependent sulfated cell surface polysaccharides. *J. Bacteriol.* 188:8560-8572.

Troisfontaines, P. y Cornelis, G.R. 2005. Type III secretion: more systems than you think. *Physiology.* 20:326-339.

Turner, G.L. y Gibson, A.H. 1980. Measurements of nitrogen fixation by indirect means. *Methods for evaluating Biological Nitrogen Fixation.* Pp. 111-133. F.J. Bergensen (ed). John Wiley and sons. Chichester, New York, USA.

van Rhijn, P.J.S., Feys, B., Verreth, C., Vanderleyden, J. 1993. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIATS99 and BRS1. *Bacteriol.* 175:438-447.

Vargas, P., Felipe, A., Michán, C., Gallegos, M.T. 2011. Induction of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:1207-1219.

Vinardell, J.M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Gottfert, M., Becker, A., Baena, I., Blom, J., Crespo-Rivas, J.C., Goesmanns, A., Jaenickes, S., Krol, E., McIntosh, M., Margaret, I., Pérez-Montaño, F., Schneiker-Bekels, S., Serranias, J., Szczepanowski, R., Buendía, A.M., Lloret, J., Bonilla, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J.E., Weidner, S. 2015. The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 28:811824.

Vinardell, J.M., Ollero, F.J., Hidalgo, Á., López-Baena, F.J., Medina, C., Ivanov Vangelov, K., Parada, M., Madinabeitia, N., Espuny, M. del R., Bellogín, R. A., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Soria-Díaz, M.E., Gil-Serrano, A.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2004b. NodR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:676-685.

Vinardell, J.M., López-Baena, F.J., Hidalgo, A., Ollero, F.J., Bellogín, R.A., Espuny, M.R., Temprano, F., Romero, F., Krishnan, H.B., Pueppke, S.G., Ruiz-Sainz, J.E. 2004a. The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *S. fredii* varies in a chromosomal background-dependent manner. *Arch. Microbiol.* 181:144-154.

Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., Kondorosi, E. 2003. Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell.* 15:2093-2105.

Vincent, J.M. 1970. Appendix III. The modified Fåhræus slide technique. In Vincent JM, editor. *A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria*. Oxford, UK. Blackwell Scientific. pp 144–145.

Viprey, V., del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W.J., Perret, X. 1998. Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Mol. Microbiol.* 28:1381-1389.

Vranová, E., Coman, D. y Grussem, W. 2013. Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64:665.700

Wang, D., Yang, S., Tang, F., Zhu, H. 2012. Symbiosis specificity in the legume rhizobial mutualism. *Cell Microbiol.* 14:334-342.

Wang, L., Helmann, J.D., Winans, S. C. 1992. The *A. tumefaciens* transcriptional activator OccR causes a bend at a target promoter, which is partially relaxed by a plant tumor metabolite. *Cell.* 69:659-667.

Weidner, S., Becker, A., Bonilla, I., Jaenicke, S., Lloret, J., Margaret, I., Pühler, A., Ruiz-Sainz, J.E., Schneiker-Bekel, S., Szczepanowski, R., Vinardell, J.M., Zehner, S., Göttfert, M. 2012. Genome sequence of the soybean symbiont *Sinorhizobium fredii* HH103. *J. Bacteriol.* 194:1617-1618.

Wek, R.C. y Hatfield, G. W. 1988. Transcriptional activation at adjacent operators in the divergent-overlapping *ilvY* and *ilvC* promoters of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 203:643-663.

Welander, P.V., Doughty, D.M., Wu, C.H., Mehay, S., Summons, R.E., Newman, D.K. 2012. Identification and characterization of *Rhodopseudomonas palustris* TIE-1 hopanoid biosynthesis mutants. *Geobiology.* 10:163-177.

Welander, P.V. y Summons, R.E. 2012. Discovery, taxonomic distribution, and phenotypic characterization of a gene required for 3-methylhopanoid production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109:12905-10.

Welander, P.V., Coleman, M.L., Sessions, A.L., Summons, R.E., Newman, D.K. 2010. Identification of a methylase required for 2-methylhopanoid production and implications for the interpretation of sedimentary hopanes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 19:8537-8542.

Whitfield, C. 2006. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 75:39-68.

White, J., Prell, J., James, E.K., Poole, P. 2007. Nutrient sharing between symbionts. *Plant Physiol.* 144:604-614.

Wilkens, S. 2015. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports.* 7:14.

Willems, A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. *Plant Soil.* 287:3-14.

Wium, M., Botes, A. y Bellstedt, D.U. 2015. The identification of *oppA* gene homologues as part of the oligopeptide transport system in mycoplasmas. *Gene.* 558:31-40.

Wojciechowski, M.F., Lavin, M. y Sanderson, M.J. 2004. A phylogeny of legumes (*Leguminosae*) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *Am. J. Bot.* 91:1846-1862.

Yamaguchi, S., Aizawa, S., Kihara, M., Isomura, M., Jones, C.J., Macnab, R.M. 1986a. Genetic evidence for a switching and energy-transducing complex in the flagellar motor of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 168:1172-1179.

Yang, S.M., Tang, F., Gao, M.Q., Krishnan, H.B., Zhu, H.Y. 2010. R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:18735-18740.

Zaloba, P., Bailey-Elkin, B.A., Derksen, M., Mark, B.L. 2016. Structural and biochemical insights into the peptidoglycan hydrolase domain of FlgJ from *Salmonella typhimurium*. *PLoS One.* 11:e0149204.

Zehner, S., Schober, G., Wenzel, M., Lang, K., Göttfert, M. 2008. Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts box* promoter. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21:1087-93.

ANEXOS

Anexo I. Material Suplementario.

Obtención de los mutantes.

Los mutantes obtenidos en esta Tesis se han realizado mediante tres estrategias: inserción del casete *lacZ-Gm^R*, recombinación simple de un fragmento central portado en el plásmido pVO155npt-SPR-npt2-GFP o por delección completa o parcial del gen a mutar. Todos los candidatos obtenidos para cada una de las mutaciones han sido comprobados por PCR e hibridación. En la siguiente tabla se muestran los cebadores empleados para dicha comprobación, así como los tamaños esperados y obtenidos para cada uno de los mutantes en gel de agarosa 0,8% (m/v).

Mutante	Capítulo	Cebadores	Banda en el mutante (pb)	Banda en el silvestre (pb)
SVQ776 (d_208)	I	d_208 FSaII/ pVO155gusA_R (Tabla 3)	700	-
SVQ777 (d_448)	I	d_448 FSaII/ pVO155gusA_R (Tabla 3)	550	-
SVQ764 (d_370)	II	shcintF/ pVO155gusA_R (Tabla 3)	600	-
SVQ765 (d_373)	II	373intF/ pVO155gusA_R (Tabla 3)	600	-
SVQ766 (d_371.5)	II	371.5F/ pVO155gusA_R (Tabla 3)	650	-
SVQ801 (<i>flgJ::lacZ</i>)	III	flgJ-A/ lacZintR (Tabla 3 y 5)	1050	-
SVQ807 (Δ <i>flgJ</i>)	III	flgJ-A/D (Tabla 5)	1500	2000
SVQ768 (Δ 347)	III	HH00347A/D (Tabla 5)	1079	1445
SVQ775 (Δ 348)	III	HH00348A/D (Tabla 5)	1117	1700

Además, para confirmar la homogenización de todos los mutantes de esta Tesis se realizaron hibridaciones siguiendo el método *Southern* descrito en el punto 1.8.13 de materiales y métodos de esta Tesis. Para ello se digirió el ADN total de los mutantes con las enzimas de restricción correspondientes. También se digirió el ADN total de la estirpe silvestre SVQ269 con las mismas enzimas de restricción que las que se utilizaron para

los mutantes. Como sonda de hibridación se usó el producto de PCR amplificado con los correspondientes cebadores para cada mutante e incorporando dNTPs marcados con digoxigenina. Mediante el ensayo de hibridación se comprobó que las estirpes mutantes presentaban un patrón de bandas diferente al de la estirpe silvestre y correspondiente a los tamaños esperados. Los cebadores empleados para el marcaje de la sonda, así como las enzimas de restricción empleadas y los tamaños de las bandas obtenidas se especifican en la siguiente Tabla.

Mutante	Capítulo	Enzima(s) de restricción utilizadas	Cebadores empleados para la sonda	Banda(s) en el mutante (pb)	Banda(s) en el silvestre (pb)
SVQ776 (d_208)	I	<i>HindIII</i>	d_208 FSaII/ d_208 RXbaI (Tabla 3)	>9000	2800
SVQ777 (d_448)	I	<i>NcoI</i>	d_448 FSaII/ d_448 RXbaI (Tabla 3)	5800	2027
SVQ764 (d_370)	II	<i>EcoRI</i>	shcintF/R (Tabla 3)	5000 3000	2000
SVQ765 (d_373)	II	<i>BamHI/HindIII</i>	373intF/R (Tabla 3)	4300 650	800
SVQ766 (d_371.5)	II	<i>EcoRI</i>	371.5F/R (Tabla 3)	5079 1530	2700
SVQ801 (<i>flgJ::lacZ</i>)	III	<i>BamHI</i>	flgJ-A/D (Tabla 5)	8000	4200
SVQ807 (Δ <i>flgJ</i>)	III	<i>EcoRI/BamHI</i>	flgJ-A/D (Tabla 5)	1900	1600 800
SVQ768 (Δ 347)	III	<i>NruI</i>	HH00347A/D (Tabla 5)	1560 1600	1770 1560 220
SVQ775 (Δ 348)	III	<i>EcoRI/HindIII</i>	HH00348A/D (Tabla 5)	3000 1160	1330 1160 1060

Anexo II. Publicaciones.

1. Publicaciones relacionadas con esta Tesis.


Acosta-Jurado, S., Alias-Villegas, C., **Navarro-Gómez, P.**, Almozara, A., Rodríguez-Carvajal, M.A., Medina, C., Vinardell, J.M. 2020. *Sinorhizobium fredii* HH103 *syrM* inactivation affects the expression of a large number of genes, impairs nodulation with soybean, and extends the host-range to the model legume *Lotus japonicus*. Environ. Microbiol. 22:1104-1124.

Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D.N., Kawaharada, Y., Rodríguez-Carvajal, M.A., Gil-Serrano, A., Soria-Díaz, M.E., Pérez-Montaña, F., Fernández-Perea, J., Yanbo, N., Jiménez-Guerrero, I., **Navarro-Gómez, P.**, López-Baena, F.J., Sandal, N., Stougaard, J., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E. 2019. *Sinorhizobium fredii* HH103 *nolR* and *nodD2* mutants gain capacity for infection thread invasion of *Lotus japonicus* Gifu and *Lotus burttii*. Environ. Microbiol. 21(5):1718-1739.

Acosta-Jurado, S., **Navarro-Gómez, P.**, Murdoch, P. del S., Crespo-Rivas, J.C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., Ruiz-Sainz, J.E., Rodríguez-Carvajal, M.A., Vinardell, J.M. 2016b. Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. PLoS One. 11:e0160499.

Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Acosta-Jurado, S., **Navarro-Gómez, P.**, Ollero, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., López-Baena, F.J., Vinardell, J.M. 2016b. A transcriptomic analysis of the effect of genistein on *Sinorhizobium fredii* HH103 reveals novel rhizobial genes putatively involved in symbiosis. Sci. Rep. 6:31592.

Sinorhizobium fredii HH103 *syrM* inactivation affects the expression of a large number of genes, impairs nodulation with soybean and extends the host-range to *Lotus japonicus*

Sebastián Acosta-Jurado,¹ Cynthia Alias-Villegas,¹ Pilar Navarro-Gómez,¹ Andrés Almozara,¹ Miguel A. Rodríguez-Carvajal,² Carlos Medina¹ and José-María Vinardell ^{1*}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, C.P., 41012, Sevilla, Spain.

²Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González 1, C. P. 41012, Sevilla, Spain.

Summary

Sinorhizobium fredii HH103 Rif^R is a broad host-range rhizobial strain able to nodulate with soybean and *Lotus burtii*, but it is ineffective with *L. japonicus*. Here, we study the role of the HH103 Rif^R SyrM protein in the regulation of gene expression and its relevance in symbiosis with those three legumes. RNAseq analyses show that HH103 SyrM is an important transcriptional regulator not only in the presence of inducer flavonoids but also in its absence. Lack of SyrM increases Nod factors production and decreases genistein-mediated repression of exopolysaccharide production in HH103. In symbiosis, mutation of *syrM* partially impaired interaction with soybean but improves effectiveness with *L. burtii* and extends the host-range to *L. japonicus* Gifu. In addition, HH103 *syrM* mutants enter in both *Lotus* species by infection threads, whereas HH103 uses the more primitive intercellular infection to enter into *L. burtii* roots. These symbiotic phenotypes were previously observed in two other HH103 mutants affected in symbiotic regulators, *nodD2* and *noIR*, revealing that in *S. fredii* HH103 numerous transcriptional regulators finely modulate symbiotic gene expression.

Introduction

The group of soil proteobacteria collectively known as rhizobia are able to enter into a symbiosis with legume plants (Poole *et al.*, 2018). In this interaction, rhizobia infect legume roots and are eventually hosted in new plant organs called nodules and usually located on the roots. Inside these organs, rhizobia invade plant cells and differentiate into bacteroids, which fix N₂ and supply the plant with ammonium (Tsyganova *et al.*, 2017; Coba de la Peña *et al.*, 2018). Thus, this symbiosis is extremely important because allows legumes to develop in nitrogen-poor ecosystems and avoid or diminish the necessity of adding chemical fertilizers, which are expensive and highly pollutant, to cropping systems.

The symbiotic interaction between rhizobia and legumes relies on a complex interchange of molecular signals, in such a way that only compatible rhizobial strains will success in infecting plant host roots and being hosted inside nodules (Oldroyd, 2013; López-Baena *et al.*, 2016). Legume roots exudate phenolic compounds called flavonoids that interact with the bacterial proteins NodD (Peck *et al.*, 2013). These proteins, that belong to the LysR family of transcriptional regulators, bind to promoter sequences called *nod* boxes (NB) and activate the expression of bacterial genes involved in the symbiotic interaction. Some of these genes (*nod*, *nol* and *noe*) are responsible for the production of molecular signals called Nod factors (NFs), which are lipochitooligosaccharides harbouring different chemical decorations. NFs are perceived by LysM type receptors located in legume root hairs and triggers different plant responses involved in the nodulation process, such as deformation of root hairs and formation of the nodule primordium (Kelly *et al.*, 2017).

Besides NFs, other bacterial molecules also play important roles in the establishment of efficient symbioses with host legumes (Downie, 2010; López-Baena *et al.*, 2016). Diverse surface polysaccharides, such as exopolysaccharide (EPS), lipopolysaccharide (LPS),

Received 30 July, 2019; accepted 12 December, 2019. *For correspondence. E-mail jvinar@us.es; Tel. +34-954554330; Fax +34-954557830.

Sinorhizobium fredii HH103 *noIR* and *nodD2* mutants gain capacity for infection thread invasion of *Lotus japonicus* Gifu and *Lotus burtii*

Sebastián Acosta-Jurado,¹
Dulce-Nombre Rodríguez-Navarro,²
Yasuyuki Kawaharada,^{3,4}
Miguel A. Rodríguez-Carvajal,⁵ Antonio Gil-Serrano,⁵
María E. Soria-Díaz,⁶ Francisco Pérez-Montaño,¹
Juan Fernández-Perea,² Yanbo Niu,⁷
Cynthia Alias-Villegas,¹ Irene Jiménez-Guerrero,¹
Pilar Navarro-Gómez,¹ Francisco Javier López-Baena,¹
Simon Kelly,³ Niels Sandal,³ Jens Stougaard,³
José E. Ruiz-Sainz¹ and José-María Vinardell^{1*}

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, C.P., 41012, Sevilla, Spain.

²IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil, Apartado Oficial 41200, Alcalá del Río, Sevilla, Spain.

³Department of Molecular Biology and Genetics, Centre for Carbohydrate Recognition and Signalling, Aarhus University, Gustav Wieds Vej 10, Aarhus, CDK-8000, Denmark.

⁴Department of Plant BioSciences, Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate, 020-8550, Japan.

⁵Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González 1, C. P, 41012, Sevilla, Spain.

⁶Servicio de Espectrometría de Masas, Centro de Investigación, Tecnología e Innovación (CITIUS), Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain.

⁷Department of Resources and Environmental Microbiology, Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, No. 68, Zhaolin Street, Daoli District, Harbin, Heilongjiang Province, China.

Summary

Sinorhizobium fredii* HH103 Rif^R, a broad-host-range rhizobial strain, forms ineffective nodules with *Lotus japonicus* but induces nitrogen-fixing nodules in *Lotus

***burtii* roots that are infected by intercellular entry. Here we show that HH103 Rif^R *noIR* or *nodD2* mutants gain the ability to induce infection thread formation and to form nitrogen-fixing nodules in *L. japonicus* Gifu. Microscopy studies showed that the mode of infection of *L. burtii* roots by the *nodD2* and *noIR* mutants switched from intercellular entry to infection threads (ITs). In the presence of the isoflavone genistein, both mutants overproduced Nod-factors. Transcriptomic analyses showed that, in the presence of *Lotus japonicus* Gifu root exudates, genes related to Nod factors production were overexpressed in both mutants in comparison to HH103 Rif^R. Complementation of the *nodD2* and *noIR* mutants provoked a decrease in Nod-factor production, the incapacity to form nitrogen-fixing nodules with *L. japonicus* Gifu and restored the intercellular way of infection in *L. burtii*. Thus, the capacity of *S. fredii* HH103 Rif^R *nodD2* and *noIR* mutants to infect *L. burtii* and *L. japonicus* Gifu by ITs and fix nitrogen *L. japonicus* Gifu might be correlated with Nod-factor overproduction, although other bacterial symbiotic signals could also be involved.**

Introduction

Rhizobia are soil α - and β -proteobacteria able to establish a symbiotic association with legumes. This plant–microbe interaction involves a complex interchange of molecular signals between the symbiotic partners (Downie, 2010; Janczarek *et al.*, 2015; López-Baena *et al.*, 2016). Successful symbiotic interactions culminate in the formation of specialized plant structures, called nodules, on the roots (also in stems in some specific symbioses) of the host plant (Oldroyd and Downie, 2008). Bacterial penetration into the developing nodule primordium generally occurs via tubular structures called infection threads (ITs). Rhizobia occupying nodules differentiate into bacteroids able to fix atmospheric nitrogen into ammonia, which can be used by the plant for its own biosynthetic activity. In return, the legume provides an appropriate environment for bacterial growth and survival.

Different modes of root invasion by rhizobia have been described and two of them have been studied in detail (Goormachtig *et al.*, 2004a). The best-known entry mode

Received 26 October, 2017; revised 4 March, 2019; accepted 4 March, 2019. *For correspondence. E-mail jvinar@us.es; Tel.: +34-954554330; Fax: +34-954557830.

RESEARCH ARTICLE

Exopolysaccharide Production by *Sinorhizobium fredii* HH103 Is Repressed by Genistein in a NodD1-Dependent Manner

Sebastián Acosta-Jurado¹, Pilar Navarro-Gómez¹, Piedad del Socorro Murdoch², Juan-Carlos Crespo-Rivas¹, Shi Jie^{1*}, Lidia Cuesta-Berrio³, José-Enrique Ruiz-Sainz¹, Miguel-Ángel Rodríguez-Carvajal³, José-María Vinardell^{1*}

1 Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain,

2 Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain, **3** Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

* Current address: Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing, P. R. of China

* jvinar@us.es



OPEN ACCESS

Citation: Acosta-Jurado S, Navarro-Gómez P, Murdoch PdS, Crespo-Rivas J-C, Jie S, Cuesta-Berrio L, et al. (2016) Exopolysaccharide Production by *Sinorhizobium fredii* HH103 Is Repressed by Genistein in a NodD1-Dependent Manner. PLoS ONE 11(8): e0160499. doi:10.1371/journal.pone.0160499

Editor: Francisco Martínez-Abarca, Estacion Experimental del Zaidin—CSIC, SPAIN

Received: April 5, 2016

Accepted: July 20, 2016

Published: August 3, 2016

Copyright: © 2016 Acosta-Jurado et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information file. RNAseq data mentioned are available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/?term=PRJNA313151>

Funding: This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Innovation (<http://www.idi.mineco.gob.es/portal/site/MICINN/>) (project BIO2011-30229-C02-01) and the Andalusia Government (<http://www.juntadeandalucia.es/organismos/economiaconocimiento.html>) (project P11-CVI-7500 of Junta de Andalucía). SAJ and PNG

Abstract

In the rhizobia-legume symbiotic interaction, bacterial surface polysaccharides, such as exopolysaccharide (EPS), lipopolysaccharide (LPS), K-antigen polysaccharide (KPS) or cyclic glucans (CG), appear to play crucial roles either acting as signals required for the progression of the interaction and/or preventing host defence mechanisms. The symbiotic significance of each of these polysaccharides varies depending on the specific rhizobia-legume couple. In this work we show that the production of exopolysaccharide by *Sinorhizobium fredii* HH103, but not by other *S. fredii* strains such as USDA257 or NGR234, is repressed by *nod* gene inducing flavonoids such as genistein and that this repression is dependent on the presence of a functional NodD1 protein. In agreement with the importance of EPS for bacterial biofilms, this reduced EPS production upon treatment with flavonoids correlates with decreased biofilm formation ability. By using quantitative RT-PCR analysis we show that expression of the *exoY2* and *exoK* genes is repressed in late stationary cultures of *S. fredii* HH103 upon treatment with genistein. Results presented in this work show that in *S. fredii* HH103 EPS production is regulated just in the opposite way than other bacterial signals such as Nod factors and type 3 secreted effectors: it is repressed by flavonoids and NodD1 and enhanced by the *nod* repressor NodR. These results are in agreement with our previous observations showing that lack of EPS production by *S. fredii* HH103 is not only non-detrimental but even beneficial for symbiosis with soybean.

Introduction

Rhizobia are soil α - and β -proteobacteria able to establish a nitrogen-fixing symbiosis with legumes. In this interaction, rhizobia induce the formation of new plant organs, called nodules, on legume roots. Inside nodule cells, rhizobia differentiate into nitrogen fixing bacteroids which provide the plant with ammonia and receive in turns organic acids [1].

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

A transcriptomic analysis of the effect of genistein on *Sinorhizobium fredii* HH103 reveals novel rhizobial genes putatively involved in symbiosis

Received: 28 May 2016

Accepted: 19 July 2016

Published: 19 August 2016

F. Pérez-Montaño, I. Jiménez-Guerrero, S. Acosta-Jurado, P. Navarro-Gómez, F. J. Ollero, J. E. Ruiz-Sainz, F. J. López-Baena & J. M. Vinardell

Sinorhizobium fredii HH103 is a rhizobial soybean symbiont that exhibits an extremely broad host-range. Flavonoids exuded by legume roots induce the expression of rhizobial symbiotic genes and activate the bacterial protein NodD, which binds to regulatory DNA sequences called *nod* boxes (NB). NB drive the expression of genes involved in the production of molecular signals (Nod factors) as well as the transcription of *ttsI*, whose encoded product binds to *tts* boxes (TB), inducing the secretion of proteins (effectors) through the type 3 secretion system (T3SS). In this work, a *S. fredii* HH103 global gene expression analysis in the presence of the flavonoid genistein was carried out, revealing a complex regulatory network. Three groups of genes differentially expressed were identified: i) genes controlled by NB, ii) genes regulated by TB, and iii) genes not preceded by a NB or a TB. Interestingly, we have found differentially expressed genes not previously studied in rhizobia, being some of them not related to Nod factors or the T3SS. Future characterization of these putative symbiotic-related genes could shed light on the understanding of the complex molecular dialogue established between rhizobia and legumes.

The symbiotic relationship between legumes and nitrogen-fixing rhizobia involves reciprocal communication by means of chemical signals produced by the plant and the bacterium. Plant root secreted flavonoids are phenolic compounds that act as inducers of the bacterial *nod* genes, which encode enzymes for the production of specific lipochitooligosaccharidic signal molecules or Nod factors (NFs) that, in turn, are responsible for root infection and induction of nodule development. Within this new organ, differentiated bacteria reduce atmospheric nitrogen to ammonia, which is assimilated by the host plant in exchange of a carbon source and an appropriate environment that promotes bacterial growth^{1,2}.

The regulatory protein NodD is constitutively expressed and codes for a LysR-type transcriptional activator that, in the presence of specific flavonoids, recognizes and binds to *nod* boxes (NB), promoter sequences located upstream of nodulation genes, triggering their transcription^{3–5}. Interestingly, many other symbiotic-related traits such as polysaccharide production, phytohormone synthesis, motility, quorum sensing, and the activation of the type 3 secretion system (T3SS) are regulated, depending on the rhizobial strain, by specific inducer flavonoids and NodD^{1,6–11}. However, to our knowledge, only a few genome-wide transcriptomic analyses of the effect of flavonoids on rhizobial gene expression have been performed so far. In *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 about 100 genes were induced with genistein, including all *nod* box-associated genes, type 3 secreted effectors, the flagellar cluster, and several genes likely involved in transport processes¹². Recently Huyghe *et al.*¹³ reported that many *Sinorhizobium fredii* NGR234 genes responded to the presence of daidzein: a total of 754 genes with a cutoff [fold-change value] ≥ 2 . Although *nod* box- and T3SS-associated genes were those showing the highest levels of induction, these results are in agreement with those reported for *B. japonicum*, that indicate that flavonoids have a much broader function than the mere induction of the *nod* genes.

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Sevilla, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.M.V. (email: jvinar@us.es)

Anexo II. Publicaciones.

2. Otras publicaciones no relacionadas con esta Tesis.

Crespo-Rivas, J.C., **Navarro-Gómez, P.**, Alias-Villegas, C., Shi, J., Zhen, T., Niu, Y., Cuéllar, V., Moreno, J., Cubo, T., Vinardell, J.M., Ruiz-Sainz, J.E., Acosta-Jurado, S., Soto, M.J. 2019. *Sinorhizobium fredii* HH103 RirA is required for oxidative stress resistance and efficient symbiosis with soybean. *Int. J. Mol. Sci.* 12:e787.

Temprano-Vera, F., Rodríguez-Navarro, D.N., Acosta-Jurado, S., Perret, X., Fossou, R.K., **Navarro-Gómez, P.**, Zhen, T., Yu, D., An, Q., Buendía-Clavería, A.M., Moreno, J., López-Baena, F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2018. *Sinorhizobium fredii* strains HH103 and NGR234 form nitrogen fixing nodules with diverse wild soybeans (*Glycine soja*) from central China but are ineffective on northern China accessions. *Front. Microbiol.* 9:2843.

Jiménez-Guerrero, I., Acosta-Jurado, S., del Cerro, P., **Navarro-Gómez, P.**, López-Baena, F.J., Ollero, F.J., Vinardell, J.M., Pérez-Montaña, F. 2017. Transcriptomic studies of the effect of *nod* gene-inducing molecules in rhizobia: different weapons, one purpose. *Genes (Basel).* 9:e1.

Acosta-Jurado, S., **Navarro-Gómez, P.**, Crespo-Rivas, J.C., Medina, C., Murdoch, P.S., Cuesta-Berrio, L., Rodríguez-Carvajal, M.A., Ruiz-Sainz, J.E., Vinardell, J.M. 2017. The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 rkp-2 region is involved in the biosynthesis of lipopolysaccharide and exopolysaccharide but not in K-antigen polysaccharide production. *Plant Soil.* 417:415-431.

Toro, N., Villadas, P.J., Molina-Sánchez, M.D., **Navarro-Gómez, P.**, Vinardell, J.M., Cuesta-Berrio, L., Rodríguez-Carvajal, M.A. 2017. The underlying process of early ecological and genetic differentiation in a facultative mutualistic *Sinorhizobium meliloti* population. *Sci. Rep.* 2017. 7:675.

Acosta-Jurado, S., Alias-Villegas, C., **Navarro-Gómez, P.**, Zehner, S., Murdoch, P.D., Rodríguez-Carvajal, M.A., Soto, M.J., Ollero F.J., Ruiz-Sainz, J.E., Göttfert, M., Vinardell, J.M. 2016c. The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 global regulator is connected with the *nod* regulon and is required for efficient symbiosis with *Lotus burtii* and *Glycine max* cv. Williams. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29:700-712.



Article

Sinorhizobium fredii HH103 *RirA* Is Required for Oxidative Stress Resistance and Efficient Symbiosis with Soybean

Juan Carlos Crespo-Rivas ^{1,†}, Pilar Navarro-Gómez ^{1,†}, Cynthia Alias-Villegas ^{1,†}, Jie Shi ², Tao Zhen ³, Yanbo Niu ³, Virginia Cuéllar ⁴, Javier Moreno ⁵ , Teresa Cubo ¹ , José María Vinardell ¹ , José Enrique Ruiz-Sainz ¹, Sebastián Acosta-Jurado ^{1,*} and María José Soto ^{4,*}

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla, Spain; jccresporivas@gmail.com (J.C.C.-R.); pnavarro2@us.es (P.N.-G.); calias@us.es (C.A.-V.); cubo@us.es (T.C.); jvinar@us.es (J.M.V.); rsainz@us.es (J.E.R.-S.)

² Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing 163000, China; shijie0456@163.com

³ Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin 150001, China; zhentao1212@126.com (T.Z.); lniuyanbo@163.com (Y.N.)

⁴ Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, c/ Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain; virginia.cuellar@eez.csic.es

⁵ Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla, Spain; onorato@us.es

* Correspondence: sacosta@us.es (S.A.-J.); mariajose.soto@eez.csic.es (M.J.S.); Tel.: +34-954-557121 (S.A.-J.); +34-958-181600 (M.J.S.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 14 January 2019; Accepted: 9 February 2019; Published: 12 February 2019



Abstract: Members of *Rhizobiaceae* contain a homologue of the iron-responsive regulatory protein *RirA*. In different bacteria, *RirA* acts as a repressor of iron uptake systems under iron-replete conditions and contributes to ameliorate cell damage during oxidative stress. In *Rhizobium leguminosarum* and *Sinorhizobium meliloti*, mutations in *rirA* do not impair symbiotic nitrogen fixation. In this study, a *rirA* mutant of broad host range *S. fredii* HH103 has been constructed (SVQ780) and its free-living and symbiotic phenotypes evaluated. No production of siderophores could be detected in either the wild-type or SVQ780. The *rirA* mutant exhibited a growth advantage under iron-deficient conditions and hypersensitivity to hydrogen peroxide in iron-rich medium. Transcription of *rirA* in HH103 is subject to autoregulation and inactivation of the gene upregulates *fbpA*, a gene putatively involved in iron transport. The *S. fredii* *rirA* mutant was able to nodulate soybean plants, but symbiotic nitrogen fixation was impaired. Nodules induced by the mutant were poorly infected compared to those induced by the wild-type. Genetic complementation reversed the mutant's hypersensitivity to H₂O₂, expression of *fbpA*, and symbiotic deficiency in soybean plants. This is the first report that demonstrates a role for *RirA* in the *Rhizobium*-legume symbiosis.

Keywords: iron; *Rhizobium*; regulation; siderophore; nitrogen-fixation; plant–bacteria interaction

1. Introduction

As for almost all living organisms, iron is an essential nutrient for bacteria but in excess it becomes toxic. This active redox metal forms part of the prosthetic group (heme or iron–sulfur clusters) of many proteins that participate in important metabolic processes such as respiration, central metabolism,



Sinorhizobium fredii Strains HH103 and NGR234 Form Nitrogen Fixing Nodules With Diverse Wild Soybeans (*Glycine soja*) From Central China but Are Ineffective on Northern China Accessions

OPEN ACCESS

Edited by:

Suhelen Egan,
University of New South Wales,
Australia

Reviewed by:

Euan James,
James Hutton Institute,
United Kingdom
Julie Ardley,
Murdoch University, Australia

*Correspondence:

Jose Maria Vinardell
jvinar@us.es

Specialty section:

This article was submitted to
Microbial Symbioses,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 09 August 2018

Accepted: 05 November 2018

Published: 21 November 2018

Citation:

Temprano-Vera F,
Rodríguez-Navarro DN,
Acosta-Jurado S, Perret X,
Fossou RK, Navarro-Gómez P,
Zhen T, Yu D, An Q,
Buendía-Clavería AM, Moreno J,
López-Baena FJ, Ruiz-Sainz JE and
Vinardell JM (2018) *Sinorhizobium*
fredii Strains HH103 and NGR234
Form Nitrogen Fixing Nodules With
Diverse Wild Soybeans (*Glycine soja*)
From Central China but Are Ineffective
on Northern China Accessions.
Front. Microbiol. 9:2843.
doi: 10.3389/fmicb.2018.02843

Francisco Temprano-Vera¹, Dulce Nombre Rodríguez-Navarro¹,
Sebastian Acosta-Jurado², Xavier Perret³, Romain K. Fossou³, Pilar Navarro-Gómez²,
Tao Zhen⁴, Deshui Yu⁴, Qi An⁴, Ana Maria Buendía-Clavería², Javier Moreno⁵,
Francisco Javier López-Baena², Jose Enrique Ruiz-Sainz² and Jose Maria Vinardell^{2*}

¹ IFAPA, Centro Las Torres-Tomejil, Seville, Spain, ² Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida Reina Mercedes, Seville, Spain, ³ Department of Botany and Plant Biology, University of Geneva, Geneva, Switzerland, ⁴ Institute of Microbiology, Heilongjiang Academy of Sciences, Harbin, China, ⁵ Departamento de Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

Sinorhizobium fredii indigenous populations are prevalent in provinces of Central China whereas *Bradyrhizobium* species (*Bradyrhizobium japonicum*, *B. diazoefficiens*, *B. elkanii*, and others) are more abundant in northern and southern provinces. The symbiotic properties of different soybean rhizobia have been investigated with 40 different wild soybean (*Glycine soja*) accessions from China, Japan, Russia, and South Korea. Bradyrhizobial strains nodulated all the wild soybeans tested, albeit efficiency of nitrogen fixation varied considerably among accessions. The symbiotic capacity of *S. fredii* HH103 with wild soybeans from Central China was clearly better than with the accessions found elsewhere. *S. fredii* NGR234, the rhizobial strain showing the broadest host range ever described, also formed nitrogen-fixing nodules with different *G. soja* accessions from Central China. To our knowledge, this is the first report describing an effective symbiosis between *S. fredii* NGR234 and *G. soja*. Mobilization of the *S. fredii* HH103 symbiotic plasmid to a NGR234 pSym-cured derivative (strain NGR234C) yielded transconjugants that formed ineffective nodules with *G. max* cv. Williams 82 and *G. soja* accession CH4. By contrast, transfer of the symbiotic plasmid pNGR234a to a pSym⁻ cured derivative of *S. fredii* USDA193 generated transconjugants that effectively nodulated *G. soja* accession CH4 but failed to nodulate with *G. max* cv. Williams 82. These results indicate that intra-specific transference of the *S. fredii* symbiotic plasmids generates new strains with unpredictable symbiotic properties, probably due to the occurrence of new combinations of symbiotic signals.

Keywords: *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Glycine max*, *Glycine soja*, rhizobia-legume symbiosis

Review

Transcriptomic Studies of the Effect of *nod* Gene-Inducing Molecules in Rhizobia: Different Weapons, One Purpose

Irene Jiménez-Guerrero ^{1,2}, Sebastián Acosta-Jurado ², Pablo del Cerro ² ,
Pilar Navarro-Gómez ², Francisco Javier López-Baena ², Francisco Javier Ollero ²,
José María Vinardell ²  and Francisco Pérez-Montaña ^{2,*} 

¹ Department of Plant Pathology and Microbiology, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76100, Israel; ijimgue@us.es

² Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla Avda, Reina Mercedes 6, Sevilla 41012, Spain; sacosta@us.es (S.A.-J.); pdelcerro@us.es (P.d.C.); pnavarro2@us.es (P.N.-G.); jlopez@us.es (F.J.L.-B.); fjom@us.es (F.J.O.); jvinar@us.es (J.M.V.)

* Correspondence: fperez@us.es; Tel.: +34-954557116

Received: 24 October 2017; Accepted: 15 December 2017; Published: 21 December 2017

Abstract: Simultaneous quantification of transcripts of the whole bacterial genome allows the analysis of the global transcriptional response under changing conditions. RNA-seq and microarrays are the most used techniques to measure these transcriptomic changes, and both complement each other in transcriptome profiling. In this review, we exhaustively compiled the symbiosis-related transcriptomic reports (microarrays and RNA sequencing) carried out hitherto in rhizobia. This review is specially focused on transcriptomic changes that takes place when five rhizobial species, *Bradyrhizobium japonicum* (= *diazoefficiens*) USDA 110, *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* 3841, *Rhizobium tropici* CIAT 899, *Sinorhizobium* (= *Ensifer*) *meliloti* 1021 and *S. fredii* HH103, recognize inducing flavonoids, plant-exuded phenolic compounds that activate the biosynthesis and export of Nod factors (NF) in all analysed rhizobia. Interestingly, our global transcriptomic comparison also indicates that each rhizobial species possesses its own arsenal of molecular weapons accompanying the set of NF in order to establish a successful interaction with host legumes.


Keywords: RNA-seq; microarray; transcriptome; nodulation; rhizobia; flavonoids; symbiosis

1. Introduction

Quantification of the global expression level of a bacterial genome in response to specific cues allows the analysis of the transcriptional responses to changing environmental conditions. Several transcriptome profiling methods have been developed in the last years. DNA microarrays and RNA sequencing (RNA-seq) are the two most used genome-wide gene expression quantification techniques [1–4].

Microarrays are based on the hybridization of oligonucleotide DNA sequences representing the entire set of genes of an organism arranged in a grid pattern with DNA molecules representing the transcriptome in a specific condition [5–7]. In contrast, in the case of the RNA-seq methodology, the whole complementary DNA (cDNA) is directly and massively sequenced. By mapping the resulting short-sequence reads onto the reference genome, both the relative and absolute expression levels of each gene can be quantified [3,8]. RNA-seq technology does not require species- or transcript-specific probes and, in comparison with microarrays, offers increased specificity and sensitivity. Interestingly, alternative transcripts, small untranslated RNA and transcription start sites can also be identified by using this technique [9,10]. However, the efficiency of RNA-seq is marred with the problem of an

The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 *rkp-2* region is involved in the biosynthesis of lipopolysaccharide and exopolysaccharide but not in K-antigen polysaccharide production

Sebastián Acosta-Jurado · Pilar Navarro-Gómez · Juan-Carlos Crespo-Rivas · Carlos Medina · Piedad del Socorro Murdoch · Lidia Cuesta-Berrio · Miguel-Ángel Rodríguez-Carvajal · José-Enrique Ruiz-Sainz · José-María Vinardell 

Received: 3 November 2016 / Accepted: 25 April 2017
© Springer International Publishing Switzerland 2017

Abstract

Background Rhizobial surface polysaccharides are important molecular determinants required for successful symbiosis with legumes. In *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* Rm41, the *rkp-2* region is involved in the biosynthesis of K-antigen polysaccharide (KPS) and lipopolysaccharide (LPS). This region is composed of two genes, *lpsL*

and *rkpK*, which are respectively responsible for the production of galacturonic and glucuronic acid.

Results In this work, we show that in *S. (Ensifer) fredii* HH103 these genes do not form a transcriptional unit and that the transcriptional rate of *rkpK* is much higher than that of *lpsL*. Inactivation of each of these genes resulted in alterations in LPS, but did not affect KPS production, which is in agreement with the lack of uronic acids in *S. fredii* HH103 KPS. Mutation of *rkpK* also impaired HH103 exopolysaccharide (EPS) production, most probably due to the presence of glucuronic acid in HH103 EPS, as well as increased bacterial autoaggregation and osmosensitivity and decreased biofilm formation on plastic surfaces. Inactivation of *rkpK* affected negatively symbiosis with cowpea but not with soybean. Mutation of *lpsL* led to a complete symbiotic impairment with cowpea, whereas soybean plants inoculated with this mutant only formed pseudonodules. In both plants, the *lpsL* mutant showed defects in root infection.

Conclusion These results confirm the symbiotic importance of HH103 LPS in symbiosis with legumes.

Responsible Editor: Euan James.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11104-017-3268-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Acosta-Jurado · P. Navarro-Gómez · J.-C. Crespo-Rivas · J.-E. Ruiz-Sainz · J.-M. Vinardell (✉)
Departamento de Microbiología, Facultad de Biología,
Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, 41012 Sevilla,
Spain
e-mail: jvinar@us.es
C. Medina
Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de
Olavide, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Junta de
Andalucía, Carretera de Utrera Km 1, 41013 Sevilla, Spain

P. Murdoch
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular,
Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina
Mercedes 6, 41012 Sevilla, Spain

L. Cuesta-Berrio · M.-Á. Rodríguez-Carvajal
Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química,
Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González 1,
41012 Sevilla, Spain

Keywords Cowpea · Exopolysaccharide · K-antigen polysaccharide · Lipopolysaccharide · *Sinorhizobium fredii* · Soybean

Abbreviations

ARA Acetylene reduction assay
CF Calcofluor

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

The underlying process of early ecological and genetic differentiation in a facultative mutualistic *Sinorhizobium meliloti* population

Nicolás Toro¹, Pablo J. Villadas¹, María Dolores Molina-Sánchez¹, Pilar Navarro-Gómez², José M. Vinardell², Lidia Cuesta-Berrio³ & Miguel A. Rodríguez-Carvajal³

The question of how genotypic and ecological units arise and spread in natural microbial populations remains controversial in the field of evolutionary biology. Here, we investigated the early stages of ecological and genetic differentiation in a highly clonal sympatric *Sinorhizobium meliloti* population. Whole-genome sequencing revealed that a large DNA region of the symbiotic plasmid pSymB was replaced in some isolates with a similar synteny block carrying densely clustered SNPs and displaying gene acquisition and loss. Two different versions of this genomic island of differentiation (GID) generated by multiple genetic exchanges over time appear to have arisen recently, through recombination in a particular clade within this population. In addition, these isolates display resistance to phages from the same geographic region, probably due to the modification of surface components by the acquired genes. Our results suggest that an underlying process of early ecological and genetic differentiation in *S. meliloti* is primarily triggered by acquisition of genes that confer resistance to soil phages within particular large genomic DNA regions prone to recombination.

Selection, genetic drift and gene flow are evolutionary forces that model microbial genomes by driving adaptation and speciation in bacteria. According to the ecotype model^{1–3}, genotypic clusters in bacterial populations evolve through the spread of acquired adaptive genes in genome-wide selective sweeps. The whole genome of the variant hitchhikes with the adaptive loci, and, after rounds of periodic selection events purging diversity genome-wide, this variant spreads, replacing the parental organism and its descendants. Likewise, the acquisition of niche-specifying genes may lead to the coexistence of distinct clusters. However, recent studies in marine bacteria and thermophilic archaea populations have suggested that adaptive loci may sweep independently of the rest of the genome, with niche-specifying variants spreading in a gene-specific sweep^{4–7}. These studies identify regions of the genome containing densely clustered divergent SNPs denoted as “islands and continents of speciation”.

Rhizobia are soil bacteria; most are able to fix nitrogen and elicit the formation of root nodules on legume plants^{8,9}, within which they convert atmospheric nitrogen (N₂) into ammonia. They mostly belong to the *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (syn. *Ensifer*) or *Bradyrhizobium* genera. *Sinorhizobium meliloti* can be found as a free-living soil organism or in symbiosis with plants of the genera *Medicago*, *Melilotus* and *Trigonella*^{10–13}. *S. meliloti* harbors a multireplicon genome consisting of a single circular chromosome (~3.65 Mb) and two large symbiotic (Sym) plasmids of ~1.3 (pSymA megaplasmid) and ~1.6 Mb (pSymB chromid) in size, together with smaller accessory plasmids¹⁴.

¹Structure, Dynamics and Function of Rhizobacterial Genomes, Grupo de Ecología Genética de la Rizosfera, Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Profesor Albareda 1, 18008, Granada, Spain. ²Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avenida de Reina Mercedes 6, 41012, Sevilla, Spain. ³Departamento de Química Orgánica, Universidad de Sevilla, C/Profesor García González, 1, 41012, Sevilla, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to N.T. (email: nicolas.toro@eez.csic.es)

The *Sinorhizobium fredii* HH103 MucR1 Global Regulator Is Connected With the *nod* Regulon and Is Required for Efficient Symbiosis With *Lotus burttii* and *Glycine max* cv. Williams

Sebastián Acosta-Jurado,¹ Cynthia Alias-Villegas,¹ Pilar Navarro-Gómez,¹ Susanne Zehner,² Piedad del Socorro Murdoch,³ Miguel A. Rodríguez-Carvajal,⁴ María J. Soto,⁵ Francisco-Javier Ollero,¹ José E. Ruiz-Sainz,¹ Michael Göttfert,² and José-María Vinardell¹

¹Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Avda. Reina Mercedes 6, C.P. 41012, Sevilla, Spain, ²Technische Universität Dresden, Institut für Genetik, Helmholtzstrasse 10, 01062 Dresden, Germany, ³Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, ⁴Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Calle Profesor García González 1, C. P. 41012, Sevilla, Spain, and ⁵Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada, Spain

Accepted 27 July 2016.

Sinorhizobium fredii HH103 is a rhizobial strain showing a broad host range of nodulation. In addition to the induction of bacterial nodulation genes, transition from a free-living to a symbiotic state requires complex genetic expression changes with the participation of global regulators. We have analyzed the role of the zinc-finger transcriptional regulator MucR1 from *S. fredii* HH103 under both free-living conditions and symbiosis with two HH103 host plants, *Glycine max* and *Lotus burttii*. Inactivation of HH103 *mucR1* led to a severe decrease in exopolysaccharide (EPS) biosynthesis but enhanced production of external cyclic glucans (CG). This mutant also showed increased cell aggregation capacity as well as a drastic reduction in nitrogen-fixation capacity with *G. max* and *L. burttii*. However, in these two legumes, the number of nodules induced by the *mucR1* mutant was significantly increased and decreased, respectively, with respect to the wild-type strain, indicating that MucR1 can differently affect nodulation depending on the host plant. RNA-Seq analysis carried out in the absence and the presence of flavonoids showed that MucR1 controls the expression of hundreds of genes (including some related to EPS production and CG transport), some of them being related to the *nod* regulon.

Legumes and a group of soil proteobacteria collectively called rhizobia (Peix et al. 2015) are able to establish a symbiotic interaction in which the microsymbiont infects plant

RNA-Seq data have been deposited in the Sequence Read Archive of the National Center for Biotechnology Information (BioProject database) under the BioProjects ID PRJNA313151 and PRJNA324263.

Current address for S. Zehner: Abteilung Mikrobiologie, Fachbereich Biologie, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin Schrödinger Straße 56, 67663 Kaiserslautern, Germany.

Corresponding author: J. M. Vinardell; Telephone: +1 34-954554330; Fax: +1 34-954557830; E-mail: jvinar@us.es

*The e-Xtra logo stands for “electronic extra” and indicates that eight supplementary figures, one supplementary table, six supplementary datasets, and supplementary methods are published online.

roots and multiplies inside a new plant organ, the nodule, in which they differentiate into nitrogen-fixing bacteroids (Oldroyd 2013; Suzuki and Kawaguchi 2014). This symbiosis is driven by a complex interchange of molecular signals between both symbionts, and therefore, the participation of diverse regulatory elements is required for a successful interaction (Downie 2010; Janczarek et al. 2015; López-Baena et al. 2016). On the bacterial side, the LysR-type transcriptional regulator NodD is activated by flavonoids exuded by the plant and induces the expression of bacterial genes related to the production of nodulation factors. These molecular signals are perceived by the plant, allowing root infection and triggering the nodule developmental program. In some rhizobia, NodD and plant flavonoids also induce the formation of a symbiotic type III secretion system (T3SS) able to inject effector proteins into plant cells in order to reduce plant defense responses (López-Baena et al. 2016). Diverse bacterial surface polysaccharides also participate in the symbiosis, acting as molecular signals required for one or both infection progression or diminishing defense responses. In addition to NodD (which can be present in different copies having different roles), other transcriptional regulators, such as TtsI (responsible for expression of the symbiotic T3SS), SyrM, and NolR, are necessary for the transition from a free-living to a symbiotically competent state and, therefore, for a successful interaction. In fact, NolR is a global regulatory protein, which, in *S. meliloti*, is required not only for the optimization of nodulation but also for bacterial growth and survival and conjugative transfer of a plasmid (Chen et al. 2005).

The RosR/MucR protein family is composed of transcriptional regulators that contain a Cys₂His₂ type zinc-finger motif (Keller et al. 1995). They are widely distributed in proteobacteria, in which they regulate very diverse processes, such as cell-cycle transition from S-phase to G1 in *Caulobacter* (Fumeaux et al. 2014), alginate production in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* (Wang et al. 2015), or expression of the plant oncogene *ipt* in *Agrobacterium* spp. (Chou et al. 1998). In the animal pathogen *Brucella melitensis*, genes encoding a type IV secretion or a quorum-sensing system are downregulated in a *mucR* deletion mutant (Dong et al. 2013). In *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and *Sinorhizobium meliloti*, RosR/MucR were first described as positive regulators of exopolysaccharide (EPS) biosynthesis (Janczarek and Skorupska 2007; Keller et al.

