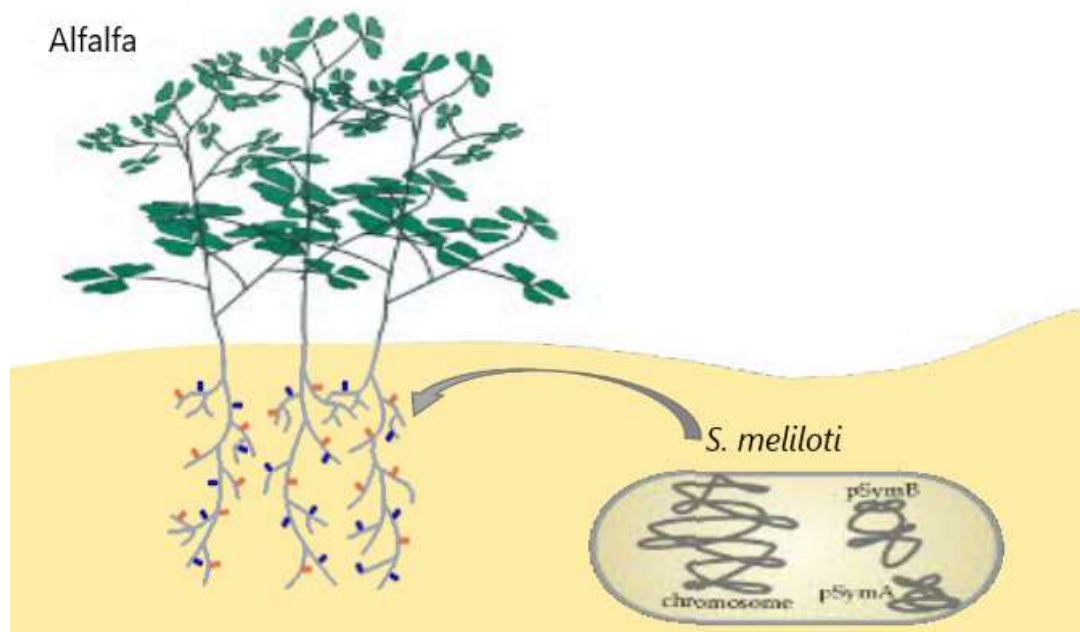


## Trabajo de Fin de Máster



Cambios fenotípicos derivados de la ausencia de las *N*-acil-homoserina lactonas en *Sinorhizobium meliloti* SVQ747.

Autora: M<sup>a</sup> Carmen Sánchez Aguilar  
Tutora: María del Rosario Espuny Gómez  
Codirectora: Cynthia Victoria Alías Villegas  
Departamento de Microbiología

Máster Universitario en  
Biología Avanzada:  
Investigación y Aplicación  
Facultad de Biología  
Universidad de Sevilla  
Curso 2021-2022

## Índice

1. Introducción.....	4
2. Materiales y métodos.....	7
2.1. Métodos utilizados en el estudio de las bacterias .....	9
2.1.1. Producción de sobrenadantes.....	9
2.1.2. Ensayo de difusión en placa para determinar la producción de AHL .....	9
2.1.3. Ensayo de producción de AHL mediante la medida de la actividad $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal).....	9
2.1.4. Movilidad, morfología de las colonias y producción de EPS.....	10
2.1.5. Ensayo de producción de EPS mediante la reacción de la Antrona Jones.....	10
2.2. Métodos utilizados para los estudios con alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> cv. Aragón).....	10
2.2.1. Desinfección y germinación de semillas .....	10
2.2.2. Ensayo de efectividad de simbiosis con la alfalfa.....	10
2.2.3. Medida del grado de competitividad por la nodulación de la alfalfa.....	10
3. Resultados y discusión.....	11
3.1. Producción de AHL.....	11
3.2. Producción de exopolisacáridos (EPS) .....	13
3.3. Movilidad .....	15
3.4. Propiedades simbióticas.....	16
4. Conclusiones y perspectivas futuras .....	18
5. Bibliografía .....	19

## Resumen

*Sinorhizobium meliloti* lleva a cabo la comunicación célula-célula mediante *quorum sensing*, que implica la producción de moléculas señal difusibles, los autoinductores, empleando los sistemas SinI/SinR y Mell/MelR y Tral/TraR, según la estirpe. Los autoinductores más conocidos de estas bacterias son las *N*-acil homoserina lactonas (AHL) que, dependiendo de longitud de la cadena acilo, difunden libremente al exterior o necesitarían la intervención de bombas de eflujo que se encuentran en la membrana, como el sistema RND. A concentraciones moderadas de AHL, la expresión de *sinI* se ve fuertemente estimulada por ExpR, una proteína de tipo "LuxR solo". Sin embargo, a concentraciones muy altas de AHL, ExpR reprime la transcripción de *sinR*, provocando una retroalimentación negativa. Las AHL en los rizobios controlan funciones como la activación de la síntesis de exopolisacáridos (EPS), la movilidad bacteriana y durante el establecimiento de la simbiosis con la planta hospedadora.

En este trabajo se estudian los cambios provocados por la ausencia de AHL sobre *S. meliloti* SVQ747, aislado de nódulos de *Medicago marina* de las marismas del Odiel, que presenta SinI/SinR y ExpR, y de SVQ749, su mutante en el sistema RND NoIG. Según los resultados obtenidos se puede concluir que, tanto en SVQ747 como en SVQ749, la ausencia de las AHL disminuye la producción de EPS totales, favorece la movilidad tipo *swimming* y, al contrario, disminuye movilidad tipo *sliding*, además de provocar la disminución en el número de nódulos desarrollados en la alfalfa, sin afectar a la efectividad de la simbiosis. Además, la capacidad competitiva por la nodulación de la alfalfa no se ve afectada por la carencia de AHL. La mutación en *noIG* no afectó a la producción de AHL por lo que la mayor capacidad competitiva de SVQ749 no puede atribuirse a una mayor o menor capacidad de exportación de AHL.

## 1. Introducción

Muchas bacterias establecen comunicación célula-célula mediante la producción de moléculas señal difusibles cuando forman parte de una comunidad bacteriana. Estas señales, llamadas autoinductores, controlan la expresión génica en respuesta a la densidad celular bacteriana; a este proceso se le conoce como quórum sensing (QS). Los autoinductores de las bacterias Gram negativas más conocidos son las *N*-acil homoserina lactonas (AHL) que, generalmente, son sintetizadas por proteínas de la familia LuxI.

A medida que aumenta la densidad de la población, las moléculas de AHL se acumulan en el medio de crecimiento y, al alcanzar una concentración umbral crítica, vuelven a entrar uniéndose y activando una proteína receptora de AHL perteneciente a la familia LuxR de reguladores transcripcionales. El complejo LuxR homólogo-AHL activa o reprime la expresión de los genes diana incluyendo, en muchos casos, la activación de la autoinductor sintasa, lo que resulta en la producción de más AHL (bucle de retroalimentación positiva) (Pearson *et al.*, 1999).

Las moléculas de AHL consisten en una cadena de acilo de longitud variable de 4 a 18 carbonos, C4-HL a C11-HL se consideran AHL de cadena corta y C12-HL a C18-HL de cadena larga, unida a un grupo de cabeza de homoserina lactona conservada (Figura 1A). Las diferencias en la longitud de la cadena de acilo, la naturaleza del sustituyente en el C3 (oxo- o hidroxi-) y la presencia de un doble enlace confieren la especificidad de la señal y determinan su permeabilidad a través de la membrana celular. Las AHL de cadena más corta se mueven a través de las membranas celulares por difusión, mientras que las AHL de cadena más larga parecen ser secretadas por bombas de eflujo que se encuentran en la membrana (Aendekerk *et al.*, 2002); como, por ejemplo, el sistema RND (Resistance-Nodulation-Cell-Division), que es un complejo tripartito compuesto por la proteína RND (el componente de la membrana interna), la proteína de fusión de la membrana (MPF, componente periplásmico) y la proteína de la membrana externa (OMP). Estas tres proteínas forman un canal a través de la envoltura de la célula Gram negativa asegurando que las moléculas puedan llegar al medio externo (Figura 1B) (Dinesh & Ayush, 2013).

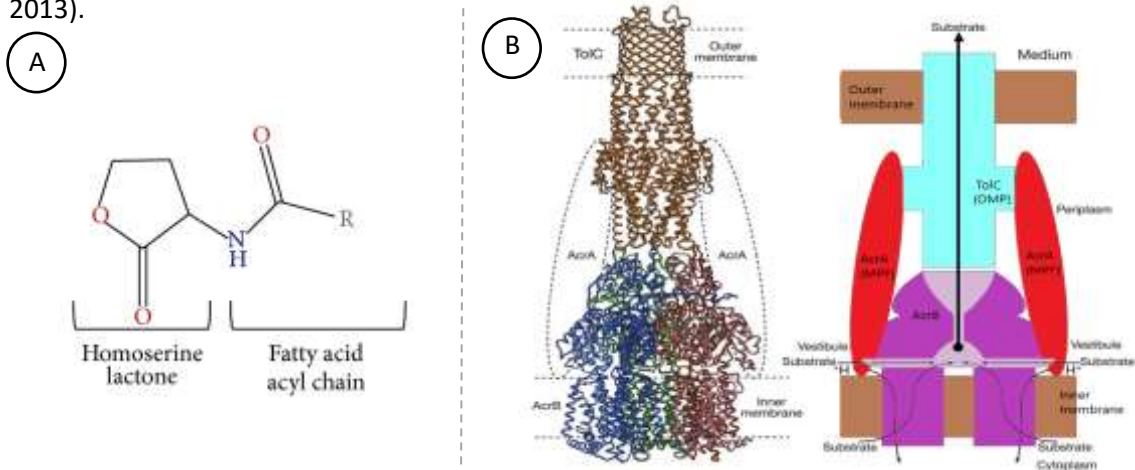


Figura 1: A) Estructura general de *N*-acil homoserina lactona (AHL), donde R representa la cadena lateral de acilo. B) Modelo del sistema RND, destacando el complejo AcrB-AcrA-TolC, donde se ve que AcrB comprende un trímero de protómeros. Comprende un cabezal extramembrana (periplásmico) y una región transmembrana. La estructura de TolC atraviesa la membrana externa. La suma de la longitud periplásmica de AcrB y es suficiente para cruzar el espacio periplásmico. Dado que el diámetro de la parte superior de la cabecera es casi igual al de la parte inferior de TolC, AcrB y TolC pueden acoplarse directamente entre sí. Por lo tanto, los dominios de los protómeros que forman la parte superior se denominan tentativamente dominios de acoplamiento TolC y el mecanismo esquemático de exportación de múltiples moléculas mediado por dicho sistema (Murakami *et al.*, 2002).

La mayoría de los sistemas de QS caracterizados hasta ahora aparecen en bacterias que establecen relaciones, patógenas o simbióticas, con plantas o animales (de Kievit & Iglewski, 2000). En el caso de *Sinorhizobium meliloti*, una bacteria Gram negativa que establece una relación simbiótica fijadora de nitrógeno con la alfalfa, *Medicago sativa*. El QS lo realiza empleando al menos dos sistemas diferentes, Sin y Mel, aunque también con el sistema Tra (Llamas *et al.*, 2004). Estos sistemas desempeñan un papel en su relación simbiótica con la alfalfa. *S. meliloti* Rm1021 y Rm41 tienen al menos dos y tres sistemas de detección de quórum, respectivamente. El sistema Mel está involucrado en la síntesis de AHL de cadena corta, como la C8-HL. El sistema Tra, también es responsable de la producción de AHL de cadena corta y regula la transferencia de plásmidos conjugativos en *S. meliloti* Rm41. El sistema Sin es responsable de sintetizar AHL de cadena larga, desde C12-HL hasta C18-HL con diferentes sustituyentes en el tercer carbono (Marketon & González, 2002).

Por otro lado, el producto del gen *expR*, una proteína de tipo “LuxR solo”, que son proteínas LuxR relacionadas con el QS que no están emparejadas con un LuxI afín (Bez *et al.*, 2021), es el principal regulador de la expresión génica controlada por AHL de cadena larga en *S. meliloti*. A concentraciones moderadas de AHL, la expresión de *sinI* se ve fuertemente estimulada por ExpR, provocando una retroalimentación positiva. Sin embargo, a concentraciones muy altas de AHL, ExpR reprime la transcripción de *sinR*, provocando una retroalimentación negativa. La presencia de AHL de cadena larga, como C16:1-HL, provoca la regulación transcripcional mediada por ExpR, lo que controla funciones como la activación de la síntesis de exopolisacáridos (EPS) y represión de la producción de flagelos (Charoenpanich *et al.*, 2013).

*S. meliloti* produce dos tipos de EPS, el succinoglicano (EPSI) y el galactoglicano (EPSII). El succinoglicano es un polímero de glucosa y de galactosa, con modificaciones de succinilo, piruvilo y acetilo. El EPSII es un polímero de glucosa acetilada y galactosa piruvilada (Jones, 2012). Ambos EPS se sintetizan en fracciones de alto y bajo peso molecular (HMW y LMW). Las fracciones LMW de succinoglicano y el EPSII se cree que están implicadas de manera importante en la simbiosis, amortiguando la respuesta inmune de las leguminosas durante la invasión (Jones *et al.*, 2008), ya que sintetizar uno de estos tipos de EPS es necesario para la invasión de *M. sativa* por *S. meliloti*, o la protección contra las especies reactivas de oxígeno encontradas durante la invasión (Rinaudi & González, 2009).

Además, la regulación de la síntesis de EPS está influenciada por una serie de factores ambientales, como los iones metálicos, la sal, la osmolaridad, el pH y la limitación de nitrógeno y fosfato. Este último induce la expresión de *sinI*, a través de PhoB, que es un regulador transcripcional que responde a la inanición de fosfato, lo que demuestra que en escasez de este nutriente se activa el QS. La regulación de la producción de succinoglicanos y EPSII está controlada por varios sistemas en *S. meliloti*, como ExoS/ChvI, SyrA/SyrM y SinI/ExpR, este último implicado en el QS (Geddes *et al.*, 2014). *S. meliloti* Rm1021 silvestre contiene un elemento de inserción que interrumpe *expR* y, como resultado, no puede sintetizar EPSII en condiciones normales (Gao *et al.*, 2005).

Las AHL unidas a ExpR activan una serie de programas de expresión temporal dependientes de sus concentraciones. Por ejemplo, los genes responsables de la producción de EPS se activan a concentraciones más bajas de AHL que las requeridas para la represión de los genes que controlan la producción de flagelos (Charoenpanich *et al.*, 2013).

Las AHL parece que participan en el proceso de nodulación, que comienza cuando los rizobios activan la proteína NodD, reguladora transcripcional de los genes *nod*, activada por flavonoides, moléculas señal liberadas por la raíz de la planta. Los productos codificados por los genes *nod* participan en la síntesis de moléculas específicas denominadas factores Nod (NF) o lipoquitooligosacáridos (LCO). Al secretarlas, las bacterias desencadenan el programa de desarrollo de la nodulación, incluida la deformación del pelo radical y la formación de primordios de nódulos en el córtex (Figura 2) (Saeki, 2011). Se sabe que las AHL pueden influir en las interacciones con las plantas, permitiendo el desarrollo de un mayor número de nódulos en sus raíces (Veliz *et al.*, 2014).

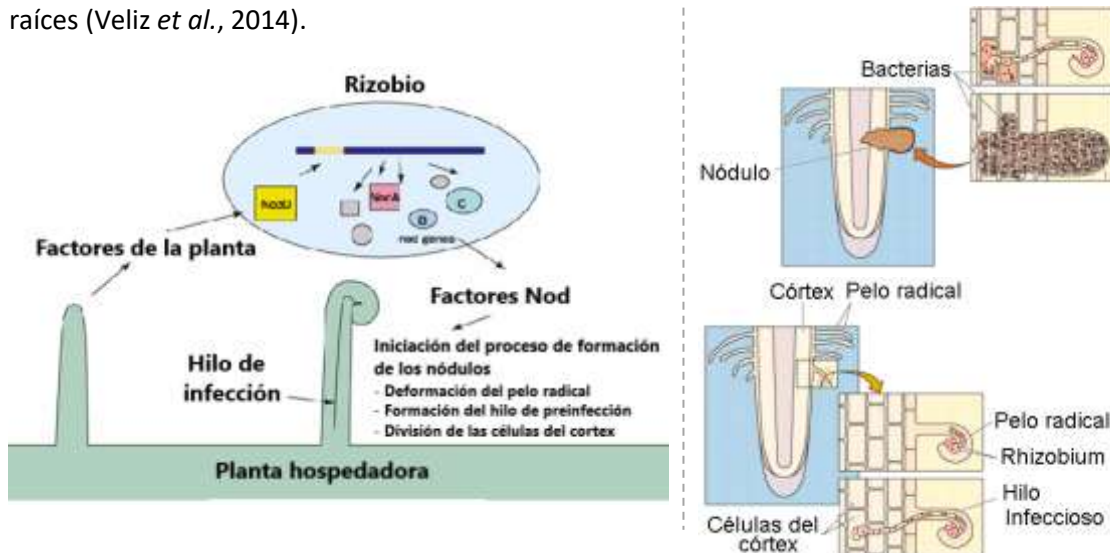


Figura 2: Esquema gráfico del proceso de infección de una raíz por un rizobio y de la nodulación. la proteína NodD, reguladora transcripcional de los genes *nod*, de los rizobios se activan al reconocen los flavonoides, liberados por la raíz de la planta. Los productos codificados por estos genes participan en la síntesis de moléculas específicas denominadas factores Nod (NF) o LCO. Al secretar estos factores se desencadena el programa de desarrollo de la nodulación, incluida la deformación del pelo radicular y la formación de primordios de nódulos en la corteza. Se forma, entonces, la que se conoce como un tubo de infección que envuelve a la bacteria. A continuación, ésta degrada la pared celular del pelo radical y lo penetra formando un tubo de celulosa conocida como tubo de infección, que conduce hacia la corteza. Comienza la división de las células corticales inducidas por los factores Nod, formándose un tumor. Al llegar, la bacteria es endocitada. Las bacterias quedan, entonces, contenidas en una estructura llamada simbiosoma donde comienzan a transformarse en bacteroides: dejan de dividirse, pierden sus flagelos subpolares, se agrandan, cambian la composición de su pared celular y su morfología y sintetizan nitrogenasa para la fijación del  $N_2$  (Barbaggelata, 2020; Tarocco, 2012).

Las bacterias presentan varios tipos de movilidad (Figura 3), algunas de ellas influenciadas por las AHL. La movilidad tipo *swimming* es un movimiento de bacterias individuales en un líquido impulsado por flagelos que pueden girar libremente. La de tipo *swarming*, también mediada por flagelos, consiste en la migración superficial de grupos de bacterias y requiere interacciones intercelulares, secreción de surfactante y un aumento en el número de flagelos. El *twitching* es el movimiento superficial de las bacterias impulsado por la extensión de los pelos tipo IV, que se adhieren a la superficie, se retraen y acercan a la célula al sitio de unión. Esto le confiere un movimiento celular lento, a menudo con una apariencia espasmódica. El *gliding* es un movimiento superficial activo que se produce a lo largo del eje longitudinal de la célula sin requerir flagelos ni pelos e implica complejos de adhesión focal. Y el movimiento tipo *sliding* es una forma pasiva de propagación superficial que no requiere un motor activo, sino que depende de los surfactantes para reducir la tensión superficial, lo que permite que la colonia se extienda desde el origen, impulsada por la presión hacia afuera del crecimiento celular (Kearns, 2010). A altas densidades de población se sabe que los genes de movilidad están reprimidos por ExpR unido a AHL (Calatrava-Morales *et al.*, 2018).

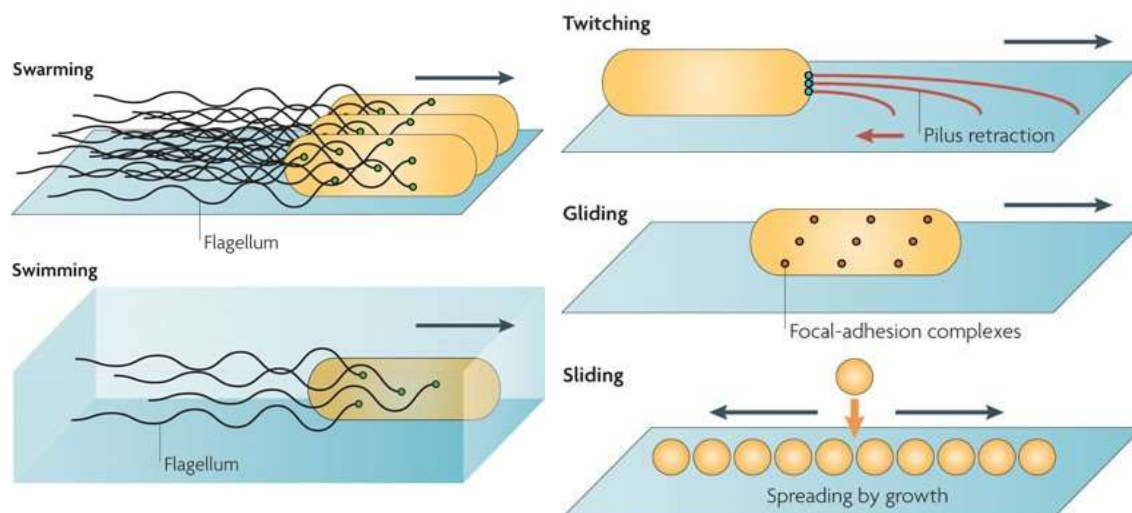


Figura 3: La movilidad tipo *swarming* es el movimiento multicelular de bacterias a través de una superficie y está impulsado por flagelos. La movilidad tipo *swimming* es el movimiento de bacterias individuales en un líquido, también impulsado por flagelos giratorios. La movilidad tipo *twitching* es el movimiento superficial de las bacterias que es impulsado por la extensión de los pelos, que luego se adhieren a la superficie y luego se retraen, acercando la célula al sitio de unión. La movilidad tipo *gliding* es un movimiento superficial activo que no requiere flagelos ni pelos e implica complejos de adhesión focal. La movilidad tipo *sliding* es una translocación superficial pasiva impulsada por el crecimiento y facilitada por un surfactante. La dirección del movimiento se indica con flechas negras y los motores que impulsan el movimiento se indican con círculos de colores (Kearns, 2010).

El microorganismo objeto de este trabajo es *S. meliloti* SVQ747, un mutante espontáneo a rifampicina obtenido a partir de ORT12, tolerante a metales pesados aislado de nódulos de *Medicago marina* de las marismas del Odiel (Huelva). En estudios anteriores, se ha demostrado que SVQ747 presenta el operón *nodMnolFGnodN* donde *nodM* y *nodN* podrían ser genes de nodulación mientras que *nolFG* pertenecen a un sistema RND de bombas de eflujo. Según los mismos estudios *nolG* parece no estar implicado en la resistencia a metales pesados ni a otras sustancias antimicrobianas, y la delección individual de *nodM*, *nodN* o *nolG* no afectó a la producción de factores Nod ni en la simbiosis con la alfalfa. Sin embargo, el mutante SVQ749, generado por inserción en el gen *nolG*, presentó una mejor capacidad competitiva por la nodulación de la alfalfa frente a la estirpe silvestre, sin afectar la eficacia de fijación de nitrógeno. Eso implicaría que las sustancias transportadas a través de *NolG* no serían esenciales para la simbiosis, pero podrían contribuir a la competitividad por la nodulación (Alías-Villegas *et al.*, 2015; Alías-Villegas, 2016). Además, se conoce que SVQ747 es productora de AHL, presenta genes *sinI*, *sinR* y, a diferencia de Sm1021 y Sm2011, un gen *expR* no interrumpido, lo que permite la síntesis de EPSII en condiciones normales y explicaría la alta mucosidad de esta bacteria (M.R. Espuny, comunicación personal). Con estos antecedentes, en este trabajo se tratará de averiguar si las AHL juegan un papel importante en la simbiosis de *S. meliloti* SVQ747 y su mutante SVQ749 con *Medicago sativa* y si existe alguna relación entre la mayor competitividad del mutante en *nolG*, SVQ749, y la producción y/o exportación de AHL.

## 2. Materiales y métodos

En la tabla 1 se muestran las estirpes bacterianas y los plásmidos empleados.

Tabla 1. Estirpes bacterianas y plásmidos empleados. Las abreviaturas Gm<sup>25</sup>, Km<sup>200</sup>, Rif<sup>50</sup> y Tc<sup>30</sup> significa resistencia a la gentamicina, la kanamicina, la rifampicina y a la tetraciclina a las concentraciones de 25, 200, 50 y 30 µg/mL, respectivamente.

BACTERIAS		
Estirpe	Características	Referencia
<b>Agrobacterium tumefaciens</b>		
NT1 (pZRL4)	<i>A. tumefaciens</i> curada del plásmido pTiC58; <i>traG::lacZ</i> , <i>traR</i> . Gm <sup>30</sup>	(Cha <i>et al.</i> , 1998)
<b>Sinorhizobium meliloti</b>		
SVQ747	ORT12, Rif <sup>50</sup>	(Alías-Villegas, 2016)
SVQ749	SVQ747 mutado en el gen <i>noIG</i> por inserción del casete <i>lacZ</i> -Gm en sentido contrario al gen. Rif <sup>50</sup> Gm <sup>25</sup>	(Alías-Villegas, 2016)
SVQ747 (pGUS3)	SVQ747 que porta el plásmido pGUS3. Rif <sup>50</sup> , Km <sup>200</sup>	(Alías-Villegas, 2016)
SVQ747 (pME6863)	SVQ747 que porta el plásmido pME6863. Rif <sup>50</sup> , Tc <sup>30</sup>	Cedida por M. R. Espuny (sin publicar)
SVQ749 (pME6863)	SVQ749 que porta el plásmido pME6863. Rif <sup>50</sup> , Tc <sup>40</sup>	Cedida por M. R. Espuny (sin publicar)
SVQ747 (pME6000)	SVQ747 que porta el plásmido pME6000. Rif <sup>50</sup> , Tc <sup>40</sup>	Cedida por M. R. Espuny (sin publicar)
SVQ749 (pME6000)	SVQ749 que porta el plásmido pME6000. Rif <sup>50</sup> , Tc <sup>40</sup>	Cedida por M. R. Espuny (sin publicar)
<b>PLÁSMIDOS</b>		
Plásmido	Características relevantes	Referencia
pME6000	Vector de clonación de amplio rango. Tc <sup>30</sup>	(Lefebre & Valvano, 2002)
pME6863	pME6000 con el gen <i>aiiA</i> bajo el control del promotor del gen <i>lacZ</i>	(Reimann <i>et al.</i> , 2002)

En la tabla 2 se describe la composición en gramos de los distintos medios de cultivos de las bacterias y las soluciones nutritivas para las plantas. Todos ellos se completaron con hasta 1 litro de agua destilada, se ajustó el pH a 7 aproximadamente y se esterilizaron en la autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de presión y a 121°C.

Tabla 2. Medios de cultivos de las bacterias y soluciones nutritivas para plantas.

Medios de cultivos de bacterias	
Compuestos	Cantidad (gramos)
<b>Medio Bromfield (Sourjik &amp; Schmitt, 1996)</b>	
Extracto de levadura	0,4
Triptona	0,1
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,1
Agar bacteriológico	3
<b>Medio YM (Vincent, 1970)</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,2
Extracto de levadura	0,1
Manitol	10/3 (10 gramos para YM10 y 3 gramos para YM3)



<b>Medio TY (Behringer, 1974)</b>	
Extracto de levadura	3
Triptona	5
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,65
<b>Solución nutritiva para plantas</b>	
<b>Rigaud &amp; Puppo (Rigaud &amp; Puppo, 1975) R&amp;P</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2
KCl	0,2
CaSO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,12
Quelato de hierro (6%)	0,0025
<b>Solución de microelementos Gibson</b>	1 mL
<b>Compuestos</b>	<b>Cantidad (gramos)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	2,08
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,22
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,08
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,11
H <sub>2</sub> O destilada	Hasta 1 litro

## 2.1. Métodos utilizados en el estudio de las bacterias

### 2.1.1. Producción de sobrenadantes

Los sobrenadantes (SB) se extraen de cultivos líquidos de los rizobios crecidos 3 días a 28°C en medio YM3 sin antibiótico, mediante 2 centrifugaciones a 13000 rpm. Se mantienen a -20°C hasta su uso.

### 2.1.2. Ensayo de difusión en placa para determinar la producción de AHL

Se utiliza el método de la doble capa. En las placas de Petri se colocan cilindros metálicos huecos de 0,8 cm de diámetro y 1 cm de altura estériles. Se vierte YM3 al 1,5% y, tras solidificar, en la doble capa se vierten 4 mL de medio YM al 0,8% de agar fundido, 60 µL de X-gal (20 µg/mL de N,N-dimetil formamida) y 400 µL de cultivo líquido del biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) crecido 3 días. Cuando se solidifica el medio se extraen los pocillos con una pinza esterilizada y se añaden 150 µL de los SB en los pocillos formados y se incuban 24-48 horas a 28°C.

### 2.1.3. Ensayo de producción de AHL mediante la medida de la actividad β-galactosidasa (β-gal)

Los cultivos se preparan con 2 mL de YM3 inoculados con 300 µL de *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) crecido 4 días, 400 µL de agua destilada estéril y 100 µL de SB. Se preparan un control positivo con 20 µL de con 3-oxo-C6-HL (10 µg/mL metanol) y 80 µL de H<sub>2</sub>O estéril y un control negativo con 100 µL de YM3. Para conocer la actividad, a 200 µL de cultivo de 24 horas, a los que se les mide sus DO<sub>660 nm</sub>, se les añaden 800 µL de tampón Z (60 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40 nM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM de KCl, 1 mM de MgSO<sub>4</sub> y 50 mM de β-mercaptoetanol), 10 µL de SDS al 0,1% y 20 µL de cloroformo. Se agitan durante 15 segundos y se añaden 200 µL de ONPG (4 mg/mL de ONPG en tampón Z). Tras el desarrollo de color amarillo, se para la reacción con 500 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M). Se mide la DO<sub>420 nm</sub> de cada reacción. Con estos datos se calculan las correspondientes actividades en Unidades Miller aplicando la siguiente fórmula: (DO<sub>420 nm</sub>\*1000)/(0,2\*DO<sub>660</sub>

nm\*15). Tras varios ensayos se hizo con el test estadístico ANOVA ( $p < 0,01$ ) la estadística de las réplicas.

#### 2.1.4. Movilidad, morfología de las colonias y producción de EPS

La movilidad tipo *swimming* se realiza en placas con medio Bromfield al 0,3% de agar, solidificadas en una superficie horizontal. Se colocan alícuotas de 3  $\mu$ L de cultivos frescos de los rizobios en TY líquido con una  $DO_{600nm}$  de 0,9-1 introduciendo la punta de la pipeta hasta aproximadamente la mitad del grosor de la capa de medio. Se dejan secar antes de incubarlas en una cámara húmeda a 28° C. El diámetro de crecimiento se mide cada 24-48 horas. Para la movilidad en superficie tipo *swarming*, se sigue el mismo protocolo, excepto que el agar se prepara al 0,7% y se inocula sin pinchar en el medio. Para estudiar la morfología de las colonias y la producción de EPS, se preparan placas de TY al 1,5% de agar, y se inoculan de la misma manera del *swarming*. Tras dejar secar todas las gotas, se tapan las placas y se incuban a 28°C hasta dos semanas. Cuando es necesario se añade calcoflúor (Fluorescent-Brightner) 0,2 mg/mL de medio.

#### 2.1.5. Ensayo de producción de EPS mediante la reacción de la Antrona Jones

Para el estudio cuantitativo de la producción de polisacáridos totales en el sobrenadante de los cultivos se usa el ensayo de la antrona-ácido sulfúrico descrito por Jones (2012), con algunas modificaciones. A 325  $\mu$ l de sobrenadante diluido 1/10 en agua destilada estéril se les añaden 650  $\mu$ l de una solución de antrona al 0,2 % (p/v) en ácido sulfúrico concentrado. Tras llevar a ebullición durante 5 minutos y esperar a su enfriamiento, se mide la  $DO_{620 nm}$  usando como blanco el medio de cultivo YM3 sometido al mismo ensayo. Los ensayos se repiten tres veces por triplicado por cada bacteria. Tras varios ensayos se hizo con el test estadístico ANOVA ( $p < 0,01$ ) la estadística de las réplicas.

### 2.2. Métodos utilizados para los estudios con alfalfa (*Medicago sativa* cv. Aragón)

#### 2.2.1. Desinfección y germinación de semillas

Las semillas se sumergen en etanol de 96°, 30 segundos, se lavan con agua destilada estéril y se tratan con hipoclorito sódico al 6% durante 15 minutos en agitación. Se lavan al menos siete veces con agua destilada estéril y se dejan 20 minutos en oscuridad con agua. Las semillas se colocan en placas con agar-agua (0,8%), y se incuban durante 24-48 horas a 28°C hasta su germinación.

#### 2.2.2. Ensayo de efectividad de simbiosis con la alfalfa

Se preparan 3 jarros Leonard (vermiculita:perlita en proporción 2:1 y con solución de R&P) por cada estirpe a estudiar. Se colocan 8 plántulas por jarro y se inoculan con 400  $\mu$ L de bacteria en YM líquido sin antibiótico con una  $DO_{600 nm}$  de 0,2, diluido 100 veces. Las plantas se cultivan en una cámara iluminada 8 semanas con una de intensidad lumínica de 500  $\mu$ E/m<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>,  $\lambda=400-700$  nm, fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura de 24/18°C día/noche y humedad relativa de un 50%. Tras este periodo, se separa la parte aérea de las raíces y se secan a 80°C durante 48 horas para obtener sus valores de peso seco y se cuenta el número de nódulos desarrollados. Tras varios ensayos se hizo con el test estadístico ANOVA ( $p < 0,01$ ) la estadística de las réplicas.

#### 2.2.3. Medida del grado de competitividad por la nodulación de la alfalfa

Para determinar la capacidad competitiva de una cepa frente a otra se coinocula junto con la cepa parental, SVQ747 portadora del plásmido pGUS3 que expresa constitutivamente el gen reportero *gusA*, que codifica la  $\beta$ -glucuronidasa. Por cada bacteria a ensayar, 14 plántulas desinfectadas se colocan en un jarro Leonard con vermiculita:perlita y se inoculan, 500  $\mu$ l por

planta, con una suspensión bacteriana que contiene una proporción 1:1 de la cepa a analizar y la cepa SVQ747 (pGUS3) con una  $DO_{600\text{nm}}$  entre 0,2 y 0,8, diluïdos 100 veces. Tras el cultivo 24 días en la cámara de plantas, se cortan las raíces, se lavan en agua destilada 15 minutos y se introducen en una solución mL de X-Gluc (Thermo Scientific, 21 mg/40mL, en tampón fosfato sódico 50 mM pH7 y SDS al 1%) durante 14 – 16 horas a 37 °C en oscuridad. Tras la incubación se cuenta el número de nódulos azules, los desarrollados por SVQ747 (pGUS3), frente a los nódulos blancos, desarrollados por las bacterias en estudio, y se compara el porcentaje de ocupación de la cepa parental con la control (SVQ747 vs. SVQ747(pGUS3)) con el de la cepa de estudio (cepa problema vs. SVQ747(pGUS3)). A los datos obtenidos se aplica test estadístico ANOVA de un factor ( $p < 0,01$ ) para determinar la capacidad competitiva de cada pareja de estirpes.

### 3. Resultados y discusión

#### 3.1. Producción de AHL

En los ensayos de difusión en placa, se obtuvo que SVQ747, SVQ749, SVQ747 (pME6000) y SVQ749 (pME6000) desarrollaron un halo azul, mientras que las estirpes portadoras del gen de la lactonasa (pME6863), al degradar las AHL, no se observaba halo (Figura 4).

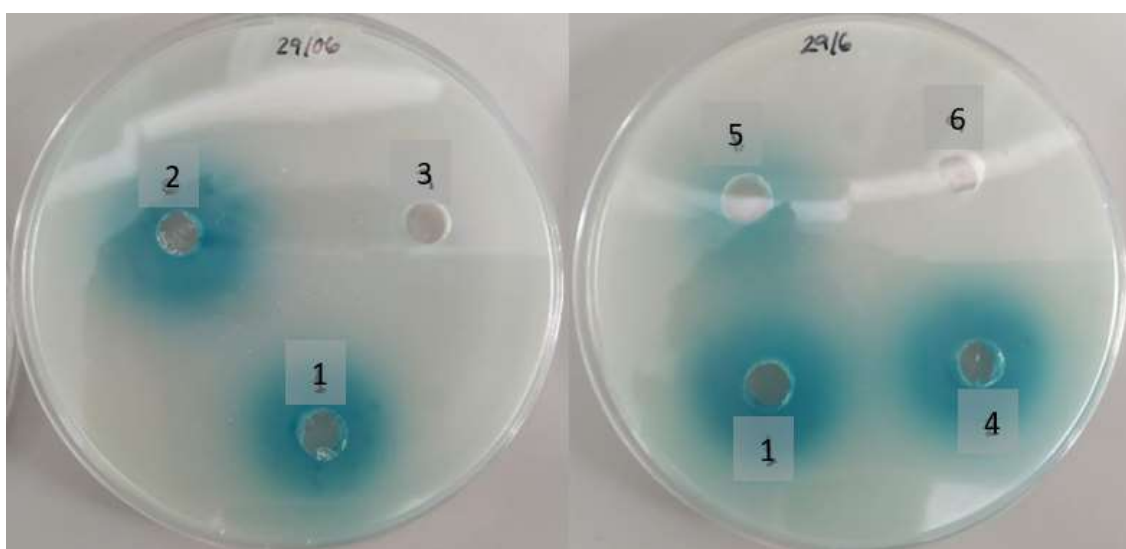


Figura 4: Análisis de la producción de AHL mediante el método de difusión empleando la técnica de la doble capa utilizando como biosensor a *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4). Se emplearon sobrenadantes de 3 días en medio YM3 de 1. SVQ747, 2. SVQ747 (pME6000), 3. SVQ747 (pME6863), 4. SVQ749, 5. SVQ749 (pME6000), 6. SVQ749 (pME6863).

Antes de comenzar el análisis cuantitativo de producción, se investigó la capacidad de respuesta de NT1 (pZLR4) a AHL con distinta longitud (C4-C18), con distintos sustituyentes en el C3 y con distintas concentraciones de AHL (50, 5 y 1  $\mu\text{g/mL}$ ). Se observó (Figura 5) que las AHL, C4-HL, C16-HL y C18-HL no indujeron actividad en NT1 (pZLR4) a ninguna de las concentraciones utilizadas. A 50  $\mu\text{g/mL}$  de AHL, no se observaron diferencias entre el resto de AHL. Cuando se usaron a una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$ , C6-HL, C12-HL y C14-HL disminuyeron su capacidad de inducción, pero no lo hicieron así las AHL con el mismo número de carbonos, pero con un sustituyente oxo o hidroxilo en el carbono 3. Y, finalmente, a 1  $\mu\text{g/mL}$ , sólo fueron activas C8-HL, 3-oxo-C8-HL, C10-HL, 3-OH-C14, 3-oxo-C14 y 3-oxo-C16. Por lo que podemos concluir que NT1(pZLR4), de las AHL ensayadas, reconoce, cuando se encuentran a baja concentración, fundamentalmente a las de 8 a 10 carbonos con o sin sustituciones en el C3, y a las de 12 a 16 carbonos sólo si presentan sustituciones.

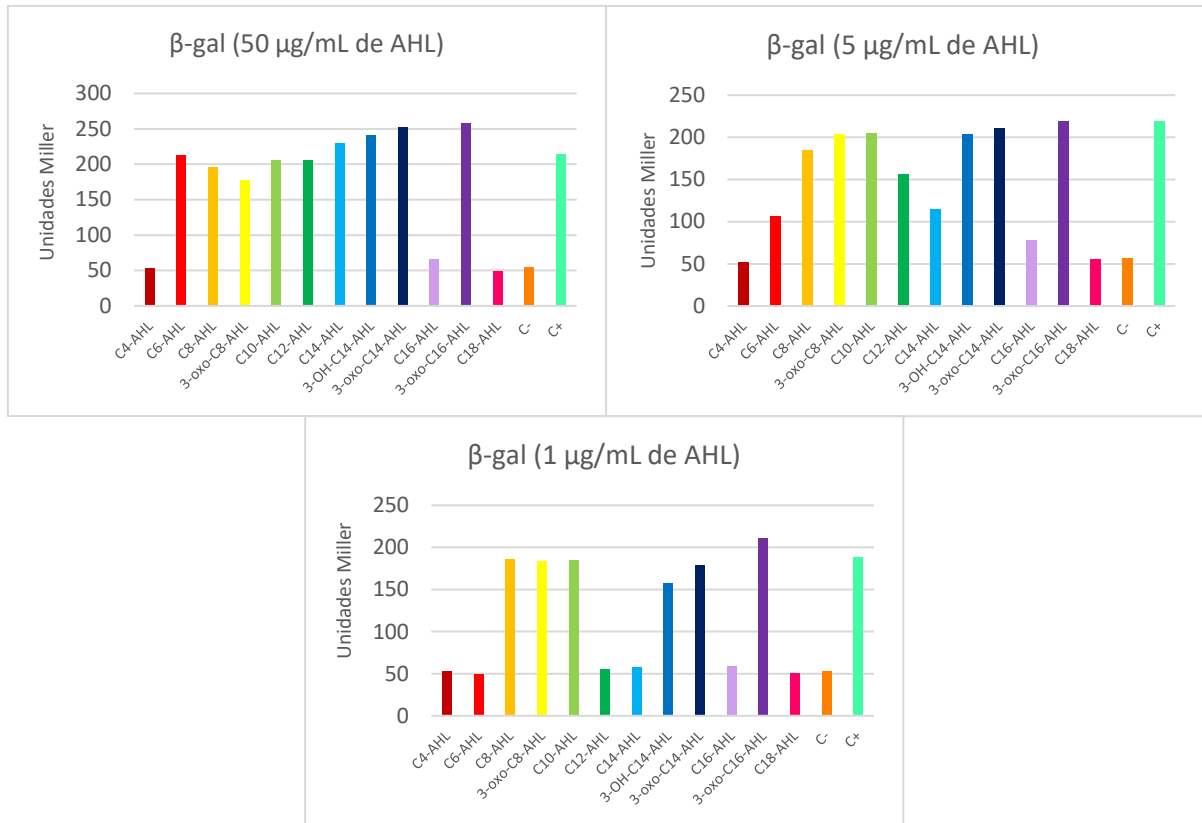
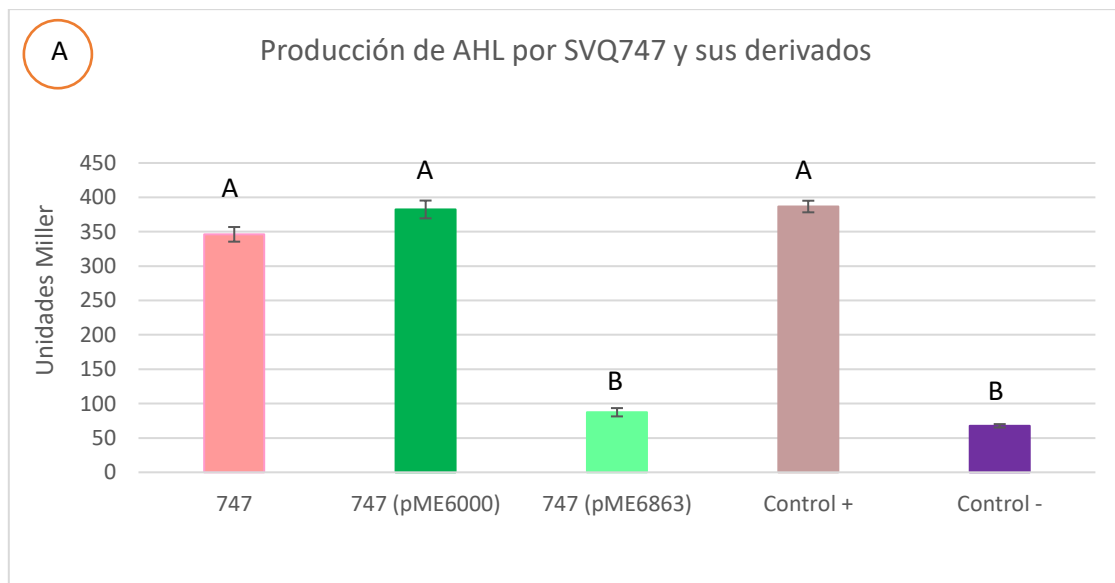


Figura 5: inducción de la actividad beta-gal en *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) por distintas AHL patrón, desde C4-HL a C18-HL, donde se incluyen la 3-oxo-C8-HL, la 3-oxo-C14-HL, la 3-OH-C14-HL y la 3-oxo-C16-HL. Se realizaron 3 ensayos de tres réplicas cada uno.

En el caso de la β-gal en medio líquido, se observó, figura 6.A, que no hubo diferencias significativas en la producción de AHL entre SVQ747 y la portadora del vector pME6000, observándose una disminución significativa de la producción en SVQ747 (pME6863). En el caso de SVQ749, figura 6.B, se observó que la mera presencia del vector pME6000 provocó una mayor producción de AHL, no encontrándose diferencias de producción entre SVQ749 y SVQ747. Igualmente, la presencia del gen de la lactonasa (pME6863) hizo que disminuyera significativamente la producción de AHL en SVQ749.



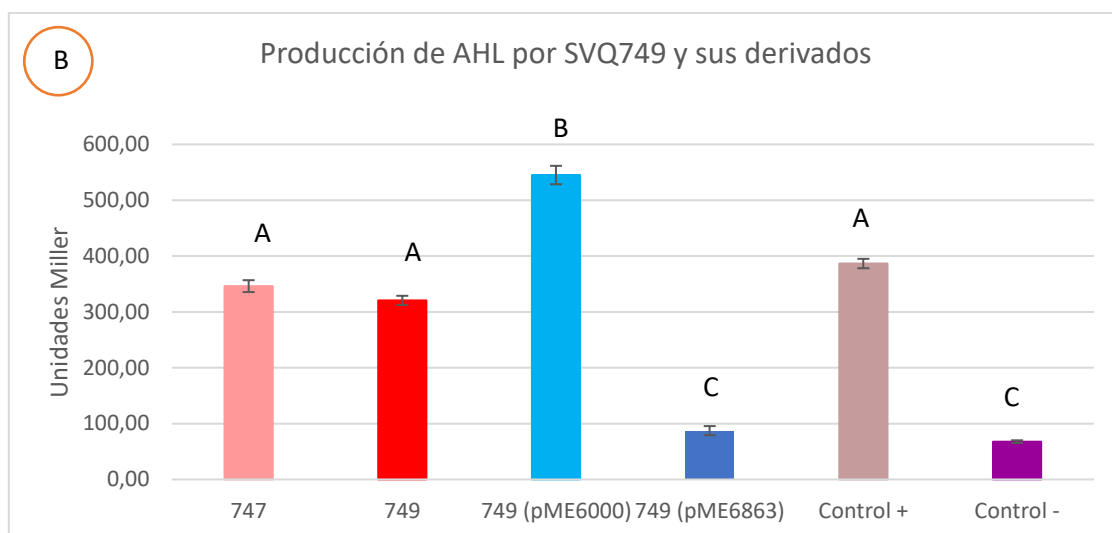


Figura 6: Producción de AHL por las distintas bacterias mediante la inducción de la actividad β-gal en medio líquido de *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) por los sobrenadantes (150 μL): A) de SVQ747 y sus derivados; B) SVQ749 y sus derivados. El control positivo está realizado con 20 μL de 3-oxo-C6-HL (10 μg/mL) y 80 μL de H<sub>2</sub>O y el control negativo con 150 μL de YM3. Las barras con la misma letra no difieren significativamente. Se realizaron 9 ensayos de tres réplicas cada uno.

### 3.2. Producción de exopolisacáridos (EPS)

Tras 14 días de cultivo en medio TY con agar al 1,5%, se observó (Figura 7) que las bacterias portadoras de la lactonasa vieron reducida su mucosidad, más acentuada en el caso de SVQ747 (pME6863). SVQ749 y sus derivados parecen más mucosos que SVQ747 y los suyos, observándose, además, una morfología característica en SVQ749 (pME6863) con un núcleo denso y halo más transparente. ExpR activado por AHL activa la producción de EPSI y, especialmente, de EPSII (Jankzarek, 2011; Calatrava-Morales *et al.*, 2018) por lo que la ausencia de AHL explicaría la menor mucosidad de las estirpes con la lactonasa.

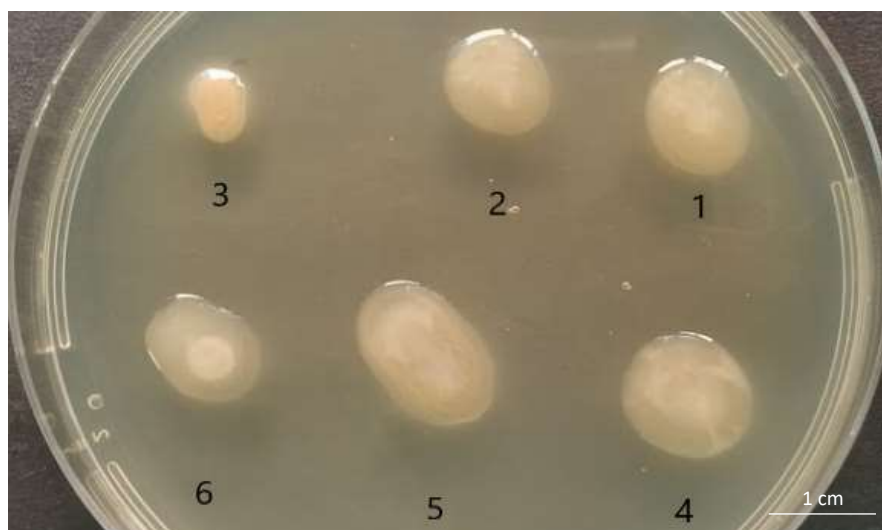


Figura 7: Aspecto de las colonias tras 14 días de crecimiento en medio TY al 1,5% de agar. 1. SVQ747, 2. SVQ747 (pME6000), 3. SVQ747 (pME6863), 4. SVQ749, 5. SVQ749 (pME6000), 6. SVQ749 (pME6863). Se realizaron 3 ensayos de tres réplicas cada uno.

Para detectar cuantitativamente cambios en la producción de EPS se empleó el método de la antrona. Se usaron los mismos SB que los usados en la producción de AHL y se observó, figura 8, que la ausencia de AHL provocó una disminución drástica y significativa de EPS en SVQ747

(Figura 8A) y en SVQ749 (Figura 8B) mientras no se detectaron cambios significativos entre SVQ747 y SVQ749 (Figura 8B). Con lo que queda demostrado que, la producción de AHL está directamente relacionada con la producción de EPS. Sin embargo, resulta sorprendente que la presencia del vector pME6000 en SVQ749 provoque una disminución significativa en la producción EPS, similar, pero en sentido contrario a lo que ocurrió en la producción de AHL, donde la aumentó (Figura 6B).

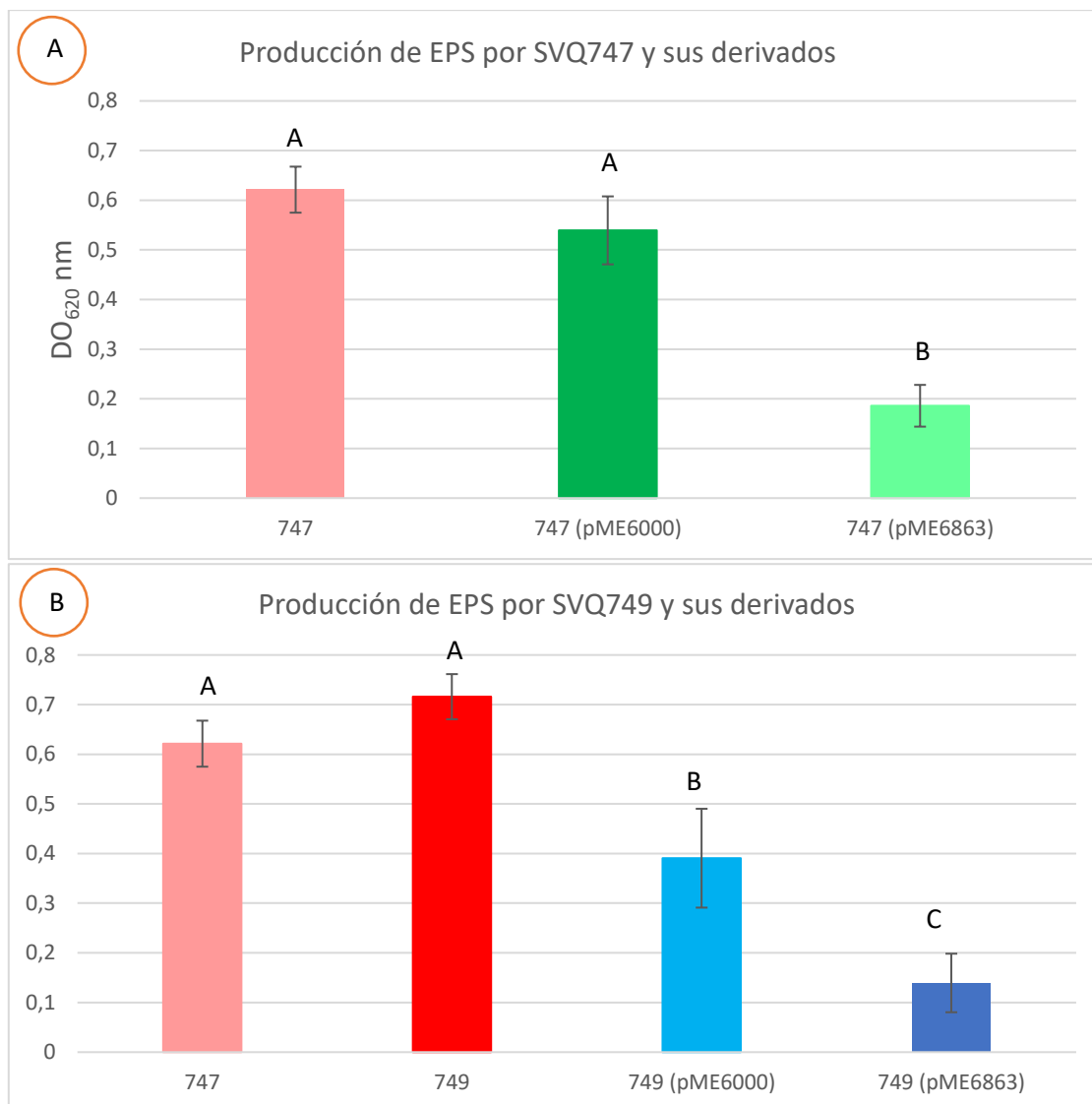


Figura 8: Representación con diagrama de barras de la producción de exopolisacáridos mediante la reacción de la antrona: A) de SVQ747, SVQ747 (pME6000) y SVQ747 (pME6863), y B) SVQ749, SVQ749 (pME6000) y SVQ749 (pME6863). Los resultados corresponden a 5 ensayos con tres réplicas cada uno. Las barras con la misma letra no difieren significativamente entre sí.

Para estudiar el aspecto de las colonias y su capacidad de unir calcoflúor se sembraron las bacterias en 3 medios, TY, YM3 y Bromfield, con calcoflúor (0,2 mg/mL) y a distinta concentración de agar, 0,3%, 0,7% y al 1,5%. Como se puede observar en la figura 9, no es posible describir ningún patrón de mayor brillo asociado a la mayor o menor producción de EPS o de AHL. En Bromfield al 0,3 % (Figura 9A) SVQ747 y sus derivados parecen más brillantes que SVQ749 y los suyos. SVQ747 (pME6863) y SVQ749 (pME6863) parecen menos brillantes en YM3 0,7% (Figura 9D).

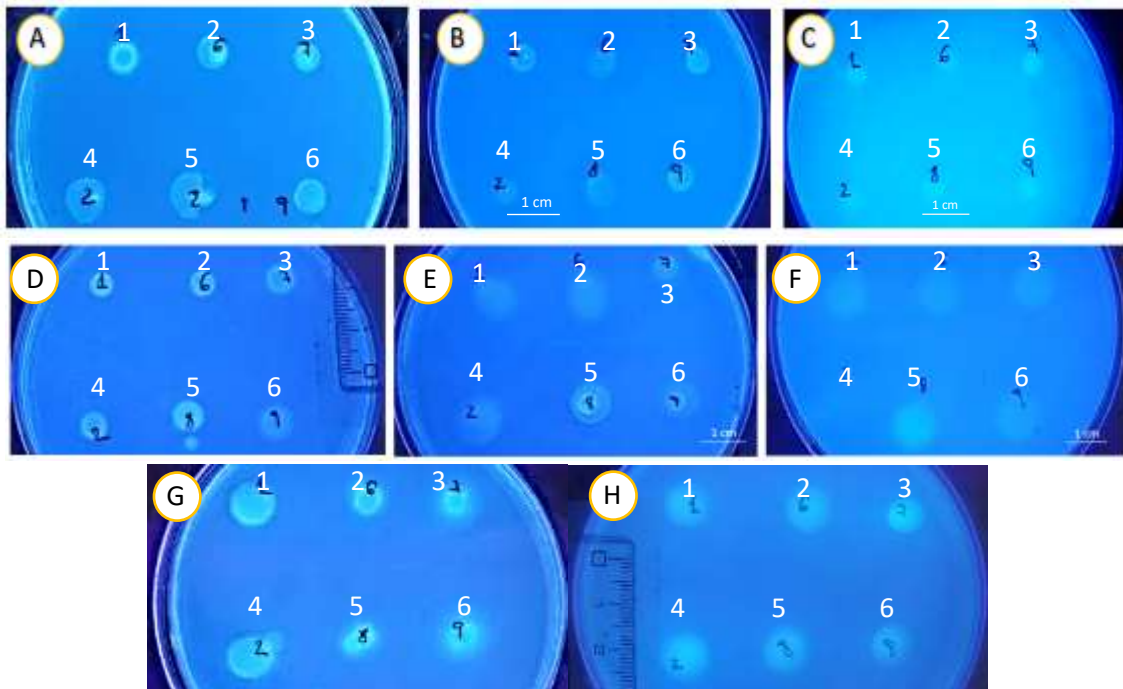


Figura 9: Aspecto de las colonias bajo luz UV tras 14 días de crecimiento en distintos medios. A, B y C, en medio Bromfield-calcoflúor con agar al 0,3% (A), al 0,7% (B) y al 1,5% (C). D, E y F, en medio YM3-calcoflúor con agar al 0,3% (D), al 0,7% (E) y al 1,5% (F). G y H, en medio TY-calcoflúor con agar al 0,3% (G) y al 0,7% (H): 1. SVQ747, 2. SVQ747 (pME6000), 3. SVQ747 (pME6863), 4. SVQ749, 5. SVQ749 (pME6000), 6. SVQ749 (pME6863). Las imágenes representan una de las tres réplicas de un único ensayo.

### 3.3. Movilidad

Tras repetir 3 veces los ensayos de movilidad en Bromfield al 0,3 % agar, que correspondería al tipo *swimming* y al 0,7% de agar, que correspondería al tipo *swarming* no se observaron diferencias entre las bacterias durante los primeros días. Sólo al cabo de 2 semanas, figura 10, se observó como las portadoras de la lactonasa tienen más movilidad tipo *swimming*, que se podría explicar porque no tendría lugar la represión de la movilidad por ExpR a altas concentraciones de AHL al carecer de estas (Figuras 10, 3 y 6).

En Bromfield al 0,7% de agar no se observó (Figura 11) crecimiento fractal típico de la movilidad *swarming*, sin embargo, sí un menor deslizamiento de la colonia en las bacterias portadoras del gen de la lactonasa, en lo que podría ser considerado a la movilidad de tipo *sliding*, que es independiente de flagelo y está favorecido por la producción de EPSII (Calatrava-Morales *et al.*, 2018).

Esta dispersión eficiente de *S. meliloti* a través del agar semisólido no se debe a la rotación flagelar, sino por dos efectos fisicoquímicos asociados con la alta concentración de polisacárido. La presión osmótica del polisacárido extrae agua del agar hacia la capa mucoide, mientras que el efecto de atracción, que se produce en el QS, empuja a las bacterias en crecimiento hacia el perímetro móvil de la colonia. Este proceso controlado se produce para que las bacterias gasten la menor cantidad de energía posible (Dilanji *et al.*, 2014).

Esto puede explicar que las bacterias portadoras del gen de la lactonasa tengan menos movilidad tipo *sliding* y menos dispersión (Figura 11). Además, SVQ749 parece tener un poco más de movilidad de los dos tipos que SVQ747.



Figura 10: Halo de movilidad en medio Bromfield al 0,3% de agar tras 14 días de cultivo. 1. SVQ747, 2. SVQ747(pME6000), 3. SVQ747(pME6863), 4. SVQ749, 5. SVQ749(pME6000), 6. SVQ749(pME6863). Se realizaron 3 ensayos de tres réplicas cada uno.

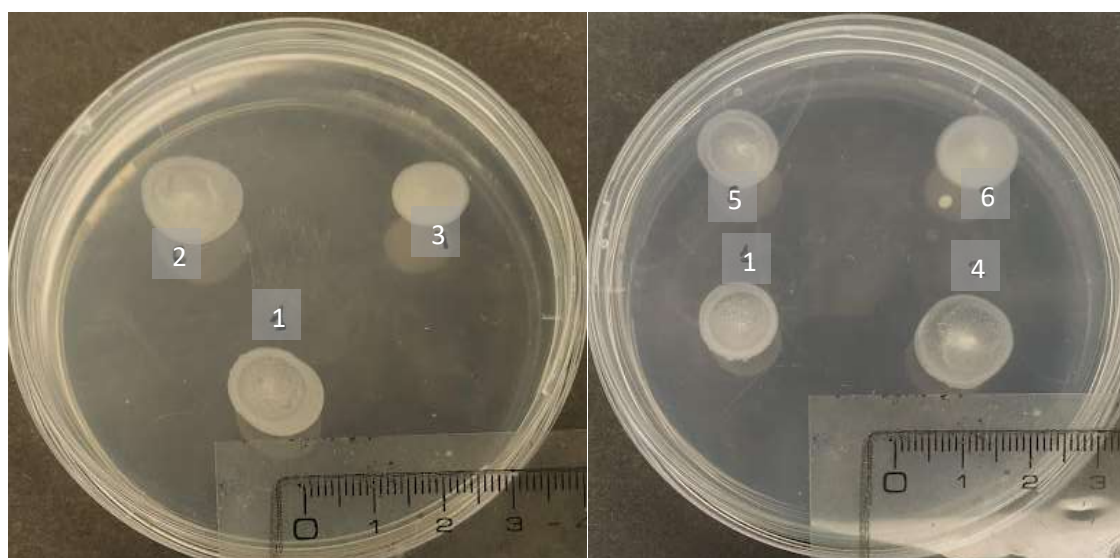


Figura 11: Movilidad en medio Bromfield al 0,7% a los 14 días. En la imagen se observan números que corresponden a las bacterias: 1. SVQ747, 2. SVQ747 (pME6000), 3. SVQ747 (pME6863), 4. SVQ749, 5. SVQ749 (pME6000), 6. SVQ749 (pME6863). Se realizaron 3 ensayos de tres réplicas cada uno.

### 3.4. Propiedades simbióticas

En los ensayos de efectividad simbiótica se observó (Figura 12) que la ausencia de AHL disminuyó significativamente la capacidad de desarrollar nódulos de SVQ747 y SVQ749 (Figura 12A), aunque este menor número de nódulos no afectó significativamente al peso seco desarrollado por las plantas (Figura 12B), que sólo se vio disminuido, aunque no significativamente, en el caso de SVQ747 (pME6863). Se ha visto que la 3-oxo-C14-HL es capaz de inducir la formación de nódulos por *S. meliloti* en leguminosas y que algunas AHL son capaces de provocar cambios en el crecimiento de raíces y el número de raíces laterales, por lo que aumenta la superficie para poder infectar (Veliz-Vallejos *et al.*, 2014), lo que podría explicar el menor número de nódulos desarrollados por las bacterias con la lactonasa. Extrañamente, la presencia del vector pME6000 provocó una disminución no significativa, en el número de nódulos en SVQ747 y en SVQ749, sin afectar al peso seco de la planta.



En lo relativo a la competición por la nodulación de la alfalfa, se observó (Figura 13) que la ausencia de AHL no afectó a la capacidad competitiva de SVQ747 ni de SVQ749, y que SVQ749 confirmó claramente su mayor competitividad. De nuevo se observó que pME6000 afectó, aunque no significativamente, a la competitividad tanto de SVQ747 subiéndola, como de SVQ749, disminuyéndola. El vector pME6000 porta el gen de resistencia a tetraciclina *tcr* y su regulador *tetR*. TetR pertenece a una familia de reguladores transcripcionales generalmente negativos y muy extendidos entre procariontas que regulan resistencia a antibióticos, frecuentemente regulando la expresión de bombas de eflujo, pero también otros mecanismos reguladores, entre ellos el QS (Ramos *et al.*, 2005). De hecho, *LuxR* de *Vibrio fischeri* es un regulador positivo que también pertenece a la familia TetR (Fidopiastis *et al.*, 2002). La presencia de *tetR* puede ser la causa de algunos de los cambios observados en estas bacterias.

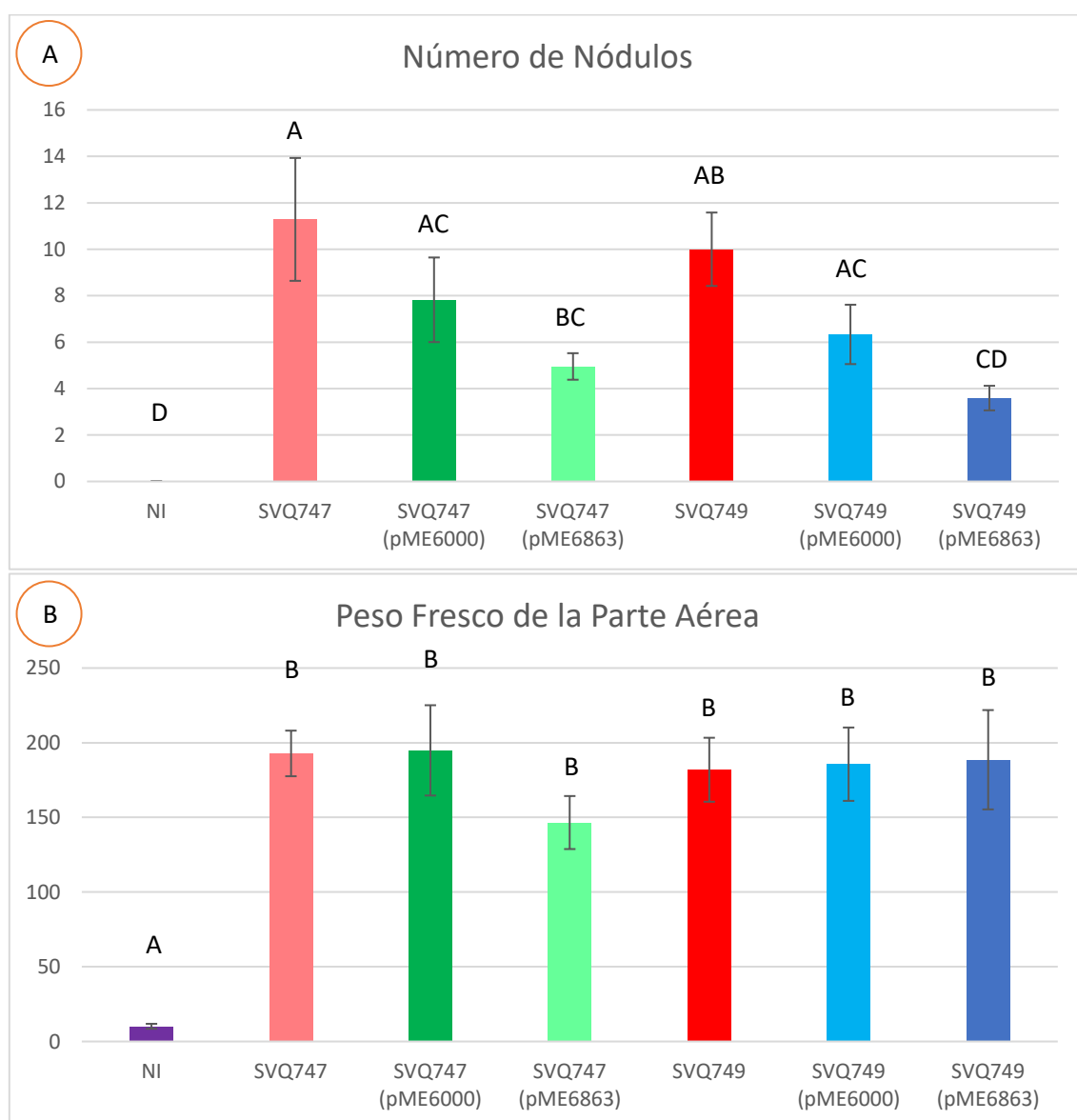


Figura 12: Efectividad simbiótica en la alfalfa tras 8 semanas de cultivo. A) Número de nódulos desarrollados, B) Peso seco de la parte aérea de la planta en mg. Las barras con las mismas letras no difieren significativamente entre sí. Los resultados corresponden a un ensayo con tres réplicas con 8 plántulas por bacteria.

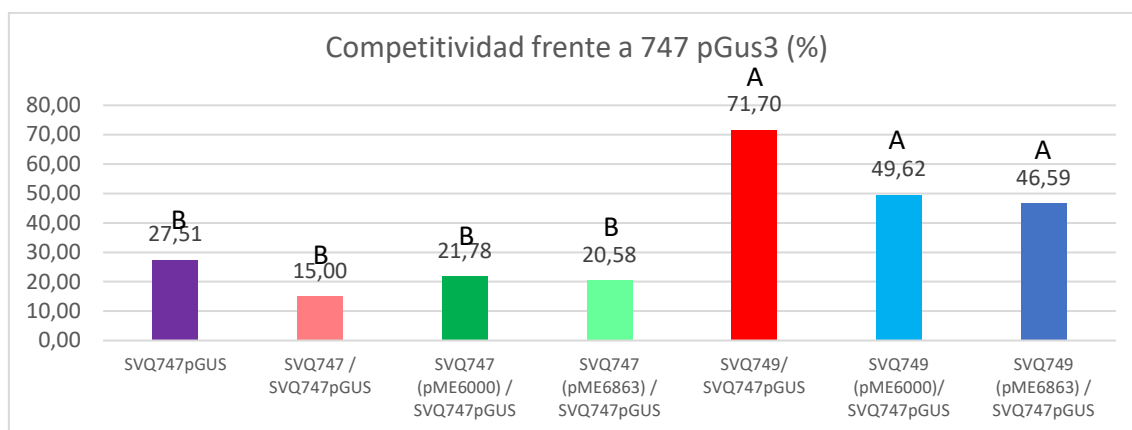


Figura 13: Ensayo del grado de competitividad por la nodulación de la alfalfa tras 24 días de cultivo en vermiculita: perlita con solución nutritiva para plantas R&P. La nodulación se realizó con las siguientes mezclas: SVQ747 (pGUS3) solo como control negativo, SVQ747 / SVQ747 (pGUS3), SVQ747 (pME6000) / SVQ747 (pGUS3), SVQ747 (pME6863) / SVQ747 (pGUS3), SVQ749 / SVQ747 (pGUS3), SVQ749 (pME6000) / SVQ747 (pGUS3), SVQ749 (pME6863) / SVQ747 (pGUS3). Los resultados corresponden a un ensayo con 14 plántulas cada una por pareja de bacterias a ensayar.

#### 4. Conclusiones y perspectivas futuras

La ausencia de las AHL disminuye significativamente la producción de EPS totales, tanto en SVQ747 como en SVQ749. Posiblemente esta disminución sea fundamentalmente en EPSII, lo que habría que demostrar en posteriores estudios. SVQ747 presenta movilidad tipo *swimming*, pero en las condiciones estudiadas no se ha podido ver la movilidad de tipo *swarming* posiblemente debido a la gran producción de EPS. En su lugar, sí presenta movilidad tipo *sliding*, que está muy influenciada por la producción de EPS. La ausencia de AHL favorece la movilidad tipo *swimming* (Figura 10-3 y 10-6). Al contrario, la movilidad tipo *sliding* es menor en las bacterias que carecen de AHL y producen menos EPS (Figura 11-3 y 11-6). Sin embargo, haría falta realizar más ensayos con medidas de diámetro y en distintos medios de cultivos, puesto que Nogales *et al.*, 2012, detectaron que la composición del medio de cultivo afecta a los distintos tipos de movilidad.

En cuanto a las propiedades simbióticas, la ausencia de AHL disminuyó significativamente el número de nódulos desarrollados en las plantas de alfalfa sin afectar a la efectividad de la simbiosis. Posiblemente habría sido necesario el peso seco de los nódulos, para determinar si un menor número de nódulos lleva consigo una menor masa nodular o no. En cuanto a la capacidad competitiva por la nodulación de la alfalfa, la ausencia de AHL no afectó significativamente ni a SVQ747 ni a SVQ749. Se vuelve a comprobar que SVQ749 es más competitivo que SVQ747. Según nuestros resultados no la podemos achacar a una mayor exportación de AHL, aunque sí podría influir una ligera mayor producción de polisacáridos y movilidad tipo *swimming* y *sliding*.

Curiosamente, según los resultados en espectrometría de masa (M.R Espuny, comunicación personal), SVQ749 produce mayor cantidad de AHL totales, lo que podría explicar su mayor competitividad. Sin embargo, la herramienta utilizada para el estudio del efecto de la ausencia de AHL, no ha sido la más correcta, dado que el vector sin el gen de la lactonasa ya afecta a los distintos fenotipos, por tanto, en el futuro habría que confirmar que SVQ747 presenta solo el sistema SinI/SinR y hacer un mutante en SinI que no produzca AHL y llevar a cabo todos estos estudios.

**Agradecimientos:** al MUBA, al Departamento, al grupo y a mi tutora María del Rosario Espuny Gómez.

## 5. Bibliografía

- Acosta-Jurado, S., Alías-Villegas, C., Almozara, A., Espuny, M., Vinardell, J., & Pérez-Montaño, F. (2020). Deciphering the Symbiotic Significance of Quorum Sensing Systems of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microorganisms*, 8(1), 68. doi:10.3390/microorganisms8010068
- Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., & Baysse, C. (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Journal of Bacteriology*, 184(20), 5686-5695. doi:10.1128/JB.184.20.5686-5695.2002
- Alías-Villegas, C. (2016). Caracterización de rizobios aislados de leguminosas del suroeste de Andalucía e implicación del gen nolG en la simbiosis Ensifer meliloti ORT12 – *Medicago sativa* (Tesis doctoral). *Universidad de Sevilla, Andalucía, España*. Obtenido de <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/44322/Tesis%20Doctoral%20Cynthia%20Al%c3%adas%20Villegas%2c%202016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Barbaggelata, N. (2020). *Terra*. Obtenido de LA SIMBIOSIS RHIZOBIUM-LEGUMINOSAS, UN MODELO SOSTENIBLE PARA LA AGRICULTURA: <https://revistaterra.com/la-simbiosis-rhizobium-leguminosas-un-modelo-sostenible-para-la-agricultura/>
- Behringer, J. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84(1), 188-198. doi:10.1099/00221287-84-1-188
- Bez, C., Covaceuszach, S., Bertani, I., Choudhary, K., & Venturi, V. (2021). LuxR Solos from Environmental Fluorescent *Pseudomonads*. *Microbial Ecology*, 6(2), e01322-20. doi:10.1128/mSphere.01322-20
- Calatraba-Morales, N., McIntosh, M., & Soto, M. (2018). Regulation Mediated by N-Acyl Homoserine Lactone Quorum Sensing Signals in the *Rhizobium-Legume* Symbiosis. *Genes*, 9(5), 263. doi:10.3390/genes9050263.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D., & Farrand, S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant associated bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(11), 1119-1129. doi:10.1094/MPMI.1998.11.11.1119.
- Charoenpanich, P., Mayer, S., Becker, A., & McIntosh, M. (2013). Temporal expression program of quorum sensing-based transcription regulation in *sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 195(14), 3224-3236. doi:10.1128/JB.00234-13
- Compton, K., Hildreth, S., Helm, R. F., & Scharf, B. E. (2020). An Updated Perspective on *Sinorhizobium meliloti* Chemotaxis to Alfalfa Flavonoids. *Frontiers in Microbiology*, 11, 581482. doi:10.3389/fmicb.2020.581482
- de Kievit, T. R., & Iglewski, B. H. (2000). Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships. *Infection and Immunity*, 68(9), 4839-4849. doi:10.1128/iai.68.9.4839-4849.2000
- Dilanji, G., Teplitski, M., & Hagen, S. (2014). Entropy-driven motility of *Sinorhizobium meliloti* on a semi-solid surface. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1784), 20132575. doi:10.1098/rspb.2013.2575

- Dinesh, M. F., & Ayush, K. (2013). Resistance-Nodulation-Division Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria: Role in Virulence. *Antibiotics*, 2(1), 163-181. doi:10.3390/antibiotics2010163
- Gao, M., Chen, H., Eberhard, A., Gronquist, M., Robinson, J., Rolfe, B., & Bauer, W. (2005). *sinI* - *expR* -Dependent Quorum Sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 187(23), 7931-7944. doi:10.1128/JB.187.23.7931-7944.2005
- Gao, M., Coggim, A., Yagnik, K., & Teplitski, M. (2012). Role of Specific Quorum-Sensing Signals in the Regulation of Exopolysaccharide II Production within *Sinorhizobium meliloti* Spreading Colonies. *PLoS One*, 7(8), e42611. doi:10.1371/journal.pone.0042611
- Geddes, B., González, J., & Oresnik, I. (2014). Exopolysaccharide Production in Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(12), 1307-1317. doi:http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-06-14-0168-R
- Jones, K. M. (2012). Increased Production of the Exopolysaccharide Succinoglycan Enhances *Sinorhizobium meliloti* 1021 Symbiosis with the Host Plant *Medicago truncatula*. *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4322-4331. doi:10.1128/JB.00751-12
- Kearns, D. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 634-644. doi:10.1038/nrmicro2405
- Lefebvre, M., & Valvano, M. (2002). Construction and Evaluation of Plasmid Vectors Optimized for Constitutive and Regulated Gene Expression in *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5956-5964. doi:10.1128/AEM.68.12.5956-5964.2002
- Llamas, I., Keshavan, N., & González, J. E. (2004). Use of *Sinorhizobium meliloti* as an Indicator for Specific Detection of Long-Chain N-Acyl Homoserine Lactones. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3715-3723. doi:10.1128/AEM.70.6.3715-3723.2004
- Marketon, M. M., Gronquist, M. R., Eberhard, A., & González, J. E. (2002). Characterization of the *Sinorhizobium meliloti* *sinR/sinI* Locus and the Production of Novel N-Acyl Homoserine Lactones. *Journal of Bacteriology*, 184(20), 5686-5695. doi:10.1128/JB.184.20.5686-5695.2002
- Marketon, M., & González, J. (2002). Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 184(13), 3466-3475. doi:10.1128/JB.184.13.3466-3475.2002
- Marketon, M., Glenn, S., Eberhard, A., & González, J. (2003). Quorum Sensing Controls Exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 185(1), 325-331. doi:10.1128/JB.185.1.325-331.2003
- McIntosh, M., Krol, E., & Becker, A. (2008). Competitive and Cooperative Effects in Quorum-Sensing-Regulated Galactoglucan Biosynthesis in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 190(15), 5308-5317. doi:10.1128/JB.00063-08
- Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E., & Yamaguchi, A. (2002). Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature*, 419, 587-593. doi:https://doi.org/10.1038/nature01050

- Nogales, J., Bernabéu-Roda, L., Cuéllar, V., & M.J. S. (2010). ExpR Is Not Required for Swarming but Promotes Sliding in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, *194*(8), 2027-2035. doi:10.1128/JB.06524-11
- Pearson, J., Delden, C. V., & Iglewski, B. (1999). Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *Journal of Bacteriology*, *181*(4), 1203-1210. doi:10.1128/jb.181.4.1203-1210.1999
- Reimann, C., Ginet, N., Michel, L., Keel, C., Michaux, P., Krishnapillai, V., . . . Haas, D. (2002). Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microbiology*, *148*(4), 923-932. doi:10.1099/00221287-148-4-923
- Rigaud, J., & Puppo, A. (1975). Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *Journal of General Microbiology*, *88*, 223-228. doi:https://doi.org/10.1099/00221287-88-2-223
- Rinaudi, L., & González, J. (2009). The Low-Molecular-Weight Fraction of Exopolysaccharide II from *Sinorhizobium meliloti* Is a Crucial Determinant of Biofilm Formation. *Journal of Bacteriology*, *191*(23), 7216-7224. doi:10.1128/JB.01063-09
- Robertsen, B., K., A. P., Darwill, A. G., Mcneil, M., & Albersheim, P. (1981). The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiology*, *67*, 389-400. doi:10.1104/pp.67.3.389
- Saeki, K. (2011). Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: A focus on two legume-rhizobium model systems. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *68*(8), 1327-1339. doi:10.1007/s00018-011-0650-5
- Sorroche, F., Rinaudi, L., Zorreguieta, A., & Giordano, W. (2010). EPS II-dependent autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells. *Current Microbiology*, *61*(5), 465-470. doi:10.1007/s00284-010-9639-9
- Sourjik, V., & Schmitt, R. (1996). Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Molecular Microbiology*, *22*(3), 427-436. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.1291489.x.
- Tarocco. (2012). *Ecopractica*. Obtenido de <http://ecopractica.blogspot.com/2012/12/factores-de-nodulacion-rhizobianos.html>
- Veliz-Vallejos, D. F., van Noorden, G. E., Yuan, M., & Mathesius, U. (2014). A *Sinorhizobium meliloti*-specific N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signal increases nodule numbers in *Medicago truncatula* independent of autoregulation. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 551. doi:10.3389/fpls.2014.00551
- Vincent, J. (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. *Blackwell Scientific Publication*.