

Departamento de Microbiología

Facultad de Biología



Mecanismos moleculares y fisiológicos que participan en el diálogo simbiótico de *Rhizobium tropici* CIAT 899 y sus leguminosas hospedadoras: reguladores transcripcionales y vesículas de membrana.

Paula Ayala García

Sevilla, 2024



Mi agradecimiento al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (**Becas Formación del Profesorado Universitario 2018**) y a la Universidad de Sevilla por hacer posible la realización de este trabajo de investigación.

Esta Tesis Doctoral corresponde al siguiente compendio de trabajos previamente publicados:

- 1) del Cerro, P^{1*}., Ayala-García, P^{1*}., Buzón, P¹., Castells-Graells, R²., López-Baena, F. J¹., Ollero, F. J¹., & Pérez-Montaña, F¹. (2020). OnfD, an AraC-type transcriptional regulator encoded by *Rhizobium tropici* CIAT 899 and involved in Nod factor synthesis and symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(19), e01297-20. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.01297-20>

CITATION: 7.

Revista Q1 (primer cuartil) en la categoría Applied Microbiology and Biotechnology.

(*) Los dos autores han contribuido por igual en este trabajo.

⁽¹⁾ Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

⁽²⁾ Department of Biological Chemistry, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom.

- 2) Ayala-García, P¹., Jiménez-Guerrero, I¹., Jacott, C². N., López-Baena¹, F. J., Ollero, F. J¹., del Cerro, P¹., & Pérez-Montaña, F¹. (2022). The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein promotes symbiosis and extends rhizobial nodulation range by constitutive nodulation factor synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 73(19), 6931-6941. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erac325>

CITATION: 4.

Revista D1 (primer decil) en la categoría Plant Sciences.

⁽¹⁾ Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

⁽²⁾ Department of Crop Genetics, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom.

- 3) Ayala-García, P¹., Moreno-de Castro, N¹., Jiménez-Guerrero, I¹., Müsken, M²., Arce-Rodríguez, A³., Pérez-Montaña, F¹., & Borrero-de Acuña, J. M¹. (2024a). Isolation, quantification, and visualization of extracellular membrane vesicles in rhizobia under free-living conditions. En *Host-Pathogen Interactions: Methods and Protocols* (pp. 219-228). New York, NY: Springer US. ISBN: 978-1-0716-3617-6. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3617-6_14

Capítulo de libro.

⁽¹⁾ Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

⁽²⁾ Central Facility for Microscopy, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

⁽³⁾ Institute of Microbiology, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany

- 4)** Ayala-García, P¹., Jiménez-Guerrero, I¹., Müsken, M²., Ollero, F. J¹., Borrero-De Acuña, J. M¹., & Pérez-Montaña, F¹. (2024b). Isolation of rhizobial extracellular membrane vesicles from bacteroids. En *Host-Pathogen Interactions: Methods and Protocols* (pp. 229-236). New York, NY: Springer US. ISBN: 978-1-0716-3617-6. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3617-6_15

Capítulo de libro.

⁽¹⁾ Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, España.

⁽²⁾ Central Facility for Microscopy, Helmholtz Centre for Infection Research, Braunschweig, Germany

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS	1
INTRODUCCIÓN	8
Importancia del nitrógeno	9
Historia y filogenia de los rizobios	11
La simbiosis rizobio-leguminosa	13
Factores determinantes en el establecimiento de la simbiosis	18
Los flavonoides	18
Los factores Nod (NFs)	19
Reguladores transcripcionales en simbiosis	21
La familia de reguladores LysR: el regulador NodD	21
La familia de reguladores AraC/XylS	23
Otros determinantes simbióticos	26
Polisacáridos de superficie bacteriana	26
Movilidad bacteriana	27
Percepción de <i>quorum</i>	27
Formación de biopelículas	28
Síntesis de ácido indol acético	28
Sistemas de secreción bacterianos	29
EL HUÉSPED: <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	31
El genoma de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	32
Síntesis y secreción de NFs en presencia de estrés osmótico y flavonoides.	36
Estudios transcriptómicos en <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	38
EL HOSPEDADOR: Las leguminosas	38
<i>Phaseolus vulgaris</i>	39
<i>Lotus japonicus</i> y <i>Lotus burtii</i>	39

Vesículas extracelulares de membrana	39
Ruta de biogénesis y cargo de las MVs en bacterias Gram-negativas	40
Procesos biológicos en los que participa	41
MVs y plantas	43
OBJETIVOS.....	45
CAPÍTULO 1.....	47
CAPÍTULO 2.....	72
CAPÍTULO 3.....	88
CAPÍTULO 4.....	99
DISCUSIÓN GENERAL	108
CONCLUSIONES.....	134
BIBLIOGRAFÍA	137

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Primera etapa de la simbiosis rizobio-leguminosa: síntesis y secreción de los factores de nodulación.	14
Figura 2. Segunda etapa de la simbiosis rizobio-leguminosa: Colonización de la raíz. (A) Tipos de colonización: vía intercelular y mediante ITs. (B) Desarrollo del IT.....	16
Figura 3. Tercera etapa de la simbiosis rizobio-leguminosa: Desarrollo del nódulo y fijación del nitrógeno atmosférico.	18
Figura 4. Estructura química general de un factor Nod, algunos de los sustituyentes identificados en diferentes especies de rizobio (círculos en color) y ejemplos de las variantes que pueden conformar la cadena de ácido graso.....	19
Figura 5. Modelo estructural de la proteína reguladora NodD1 de <i>R. tropici</i> CIAT 899. Imagen elaborada en Phyre ²	23
Figura 6. Modelo general de actuación de los reguladores transcripcionales de la familia AraC/XylS.	25
Figura 7. Otros determinantes importantes en el establecimiento de la simbiosis: movilidad bacteriana, polisacáridos bacterianos, <i>Quorum sensing</i> y formación de <i>biofilm</i> , síntesis de ácido indol acético (AIA) y sistemas de secreción bacterianos.	30
Figura 8. Árbol filogenético basado en la secuenciación del ARNr 16s de <i>R. tropici</i> CIAT 899 y otras especies de <i>Rhizobium</i>	32
Figura 9. Genes simbióticos y NBs identificadas en el plásmido simbiótico de <i>R. tropici</i> CIAT 899.....	34
Figura 10. Cromatografía en capa fina (TLC, del inglés Thin Layer Chromatography) del perfil de NFs liberados por la estirpe silvestre (WT) y los mutantes en los genes <i>nodD1</i> y <i>nodD2</i> en diferentes condiciones: C (sin molécula inductora), S (NaCl 300 mM) y A (Apigenina 3,7 μM).	37
Figura 11. Tipos de MVs en base al mecanismo de liberación al medio extracelular y a	

su estructura: OIMV (*Outer-Inner Membrane Vesicles*) y OMV (*Outer Membrane Vesicles*)..... 41

Figura 12. Modelo comparativo de la liberación de una molécula señal al medio extracelular mediante difusión pasiva (A) y a través de vesículas de membrana (B)... 42

Figura 13. Modelo de regulación de los genes *nodD2* y *onfD* de *R. tropici* CIAT 899 en ausencia (A) y presencia (B) de un estrés osmótico en el medio. 114

Figura 14. Análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras de MVs aisladas a partir de cultivos de CIAT 899 suplementados con el flavonoide apigenina y sin suplementar (condición control). (A) Imagen tomada a microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las MVs aisladas a partir de un cultivo suplementado con apigenina. (B) Valores de fluorescencia detectados en las muestras de MVs tras la aplicación de un colorante lipídico (C) Valores de concentración y tamaño de las partículas presentes en las muestras de MVs aisladas con y sin el flavonoide apigenina registrados por *Nano-sight*. 125

Figura 15. Modelo de secreción de NFs en *R. tropici* CIAT 899 ante la presencia del flavonoide apigenina. (A) Los NFs se anclan a la membrana celular, lo que favorece la formación de MVs en las que son transportados al medio extracelular. (B) Los NFs se liberan al medio a través de transportadores de membrana y posteriormente se anclan a la superficie de las MVs. C: Tras la conversión de los NFs hacia la cara externa de la superficie celular se liberan en vesículas..... 127

Figura 16. Análisis mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las muestras de MVs aisladas del espacio peribacteroideo de los nódulos desarrollados en la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. tropici* CIAT 899. 130

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación actual de los diferentes géneros de rizobios y el número de especies que se incluyen en cada uno de ellos.....	12
Tabla 2. Algunos de los genes de nodulación mejores caracterizados implicados en la síntesis de NFs en los rizobios.....	20
Tabla 3. Componentes del genoma de <i>R. tropici</i> CIAT 899 y otros datos relevantes... 33	
Tabla 4. Genes simbióticos presentes en el pSym de <i>R. tropici</i> CIAT 899 y su función.	34
Tabla 5. Algunas de las proteínas identificadas en las MVs liberadas por los bacteroides de <i>R. tropici</i> CIAT 899 de los nódulos desarrollados en <i>P. vulgaris</i>	131

ABREVIATURAS

AI: Autoinductor

AIA: Ácido indol acético

ARNr: ARN ribosómico

ARNs: ARN pequeños

ARNt: ARN transferente

ARN-seq: Secuenciación de ARN

EPS: Exopolisacárido

FBN: Fijación biológica de nitrógeno

GC: Glucano cíclico

IT: Tubo de infección

KPS: Polisacárido capsular tipo antígeno K

LCO: Lipo-quitin-oligosacárido

LPS: Lipopolisacárido

MV: Vesículas de membrana

N₂: Nitrógeno atmosférico

NF: Factor de nodulación

NB: Caja de nodulación

OMV: Vesículas de membrana externa

OIMV: Vesículas de membrana externa-interna

pSym: Plásmido simbiótico

QS: Percepción de quórum (*Quorum Sensing*)

T*SS: Sistemas de secreción de tipo * (número)

TLC: Cromatografía de capa fina

TEM: Microscopía de transmisión electrónica

**RESUMEN GLOBAL
DE LOS RESULTADOS**

Los rizobios, son bacterias presentes en el suelo con la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (N_2) en simbiosis con las plantas leguminosas. En esta relación mutualista, la planta ofrece nutrientes y un microambiente óptimo, los denominados nódulos, donde los rizobios llevan a cabo la fijación biológica de nitrógeno (FBN). A cambio; la planta satisface sus requerimientos de nitrógeno asimilando los productos resultantes de la FBN. El nitrógeno es uno de los elementos limitantes más importantes en el crecimiento de las plantas. Así, la simbiosis rizobio-leguminosa contribuye a la mejora del rendimiento de los cultivos de forma natural y sostenible, planteándose como alternativa al uso de fertilizantes y agroquímicos, ya que estos generan un fuerte impacto sobre el medio ambiente.

Este proceso biológico requiere de una alta especificidad entre el microsimbionte (los rizobios) y el macrosimbionte (la planta). La proteína reguladora NodD de los rizobios es uno de los elementos claves en esta especificidad y en el reconocimiento de ambos organismos en la rizosfera. Esta proteína censa los flavonoides presentes en los exudados de las raíces de las leguminosas y se activa ante la presencia de un flavonoide compatible. Una vez activa, induce la expresión de los genes *nod* (genes de nodulación), que codifican para proteínas encargadas de la síntesis y secreción de unas moléculas denominadas factores de nodulación (NFs). Una vez liberados a la rizosfera, los NFs son reconocidos por receptores específicos de la planta, lo que desencadena la entrada del rizobio a la raíz y el desarrollo de los nódulos, donde se generan las condiciones idóneas para que los rizobios se diferencien a formas capaces de fijar el N_2 .

La estirpe *Rhizobium tropici* CIAT 899 es un organismo idóneo para los estudios simbióticos ya que se trata de una estirpe promiscua, con la capacidad de nodular un amplio rango de plantas hospedadoras, además de tolerar diferentes condiciones estresantes en el medio, como por ejemplo la acidez, sequía y salinidad de los suelos. A nivel genómico, CIAT 899, resulta interesante por portar en su genoma cinco copias diferentes del gen *nodD* (*nodD1*, *nodD2*, *nodD3*, *noD4* y *nodD5*), una característica atípica en la mayoría de rizobios. Sin embargo, el dato más revelador de esta estirpe es su capacidad para sintetizar NFs en condiciones de estrés osmótico independientemente de la presencia de un flavonoide compatible. La secuenciación del genoma de CIAT 899 y los posteriores estudios transcriptómicos llevados a cabo en esta bacteria, han permitido demostrar que las proteínas reguladoras NodD1 y NodD2 lideran la síntesis y liberación de los NFs en presencia de apigenina y bajo condiciones de estrés osmótico,

respectivamente. Además, los últimos estudios de ARN-seq han revelado que, tanto en presencia de apigenina como bajo condiciones de estrés osmótico, se activan el mismo grupo de genes simbióticos, a excepción de los genes *nodD2* y *rtciat899_pb01075*, que se activan únicamente en condiciones de estrés osmótico.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, uno de los objetivos que se plantean en esta Tesis Doctoral es estudiar el papel del gen *rtciat899_pb01075* de CIAT 899, que codifica para un regulador transcripcional de la familia de reguladores AraC y al que se le ha denominado, OnfD. Con este propósito, se ha construido un mutante de CIAT 899 en el gen *onfD* y se ha estudiado su fenotipo simbiótico mediante diferentes técnicas de análisis de expresión de los genes simbióticos, estudios de secreción de NFs y ensayos de nodulación en plantas. Esto ha permitido demostrar que el regulador OnfD es esencial en la síntesis de NFs ante una condición de estrés osmótico. Además, se han realizado ensayos de interacción proteína-proteína que han demostrado que los reguladores NodD2 y OnfD podrían interaccionar llevando a cabo conjuntamente la activación transcripcional de los genes simbióticos bajo un estrés osmótico. Estos datos se recogen en del Cerro *et al.*, 2020, en el que la doctoranda figura como co-primera autora, y al que corresponde el primer capítulo de esta Tesis Doctoral.

Por otro lado, continuando con el estudio de los mecanismos moleculares que regulan la síntesis de NFs en CIAT 899, se ha querido estudiar el papel de cada regulador NodD en solitario, sin la influencia del resto de reguladores NodD. Para ello, se ha construido una batería de estirpes en un fondo mutante afectado en los cinco genes *nodD*, que portan de forma aislada cada de los genes *nodD* bajo la influencia de su propio promotor, así como de un promotor constitutivo. De esta forma, se ha llevado a cabo un estudio en el que se integran análisis de expresión de los genes simbióticos, ensayos de nodulación en diferentes plantas leguminosas y ensayos de colonización a microscopía en las diferentes estirpes. Como resultado, se ha demostrado que el regulador NodD2, a diferencia de NodD1, no se activa por la presencia de una molécula inductora en el medio, si no que su papel activando la expresión de los genes *nod* en condiciones de estrés osmótico es consecuencia de un aumento de sus niveles citoplasmáticos. Además, en este estudio se demuestra que el producto de la sobreexpresión del gen *nodD2* de CIAT 899 puede modificar el rango de hospedador en otros rizobios. Sin embargo, sigue sin ser clara la función de los reguladores NodD3, NodD4 y NodD5 en simbiosis. Estos datos se

presentan en Ayala-García *et al.*, 2022, trabajo al que corresponde el segundo capítulo de la presente Tesis.

Finalmente, la última parte de esta Tesis doctoral aleja el foco de estudio sobre el modo de regulación de los genes simbióticos de CIAT 899. No obstante, se mantiene el objetivo común en la búsqueda de aquellos elementos que participen en la simbiosis rizobio-leguminosa. De este modo, los dos últimos capítulos se centran en estudiar el papel de las vesículas de membrana (MVs) liberadas por los rizobios durante el proceso simbiótico. Las MVs son esferas lipídicas que emergen de la envoltura celular y están involucradas en numerosos procesos celulares, como en la respuesta a estrés, en patogenicidad, en la adquisición de nutrientes y metales o en la transferencia horizontal de material genético. En los últimos años ha cobrado protagonismo el estudio de las MVs secretadas por organismos patógenos y su interacción con plantas, lo que ha permitido conocer que estas partículas asumen un papel importante modelando la respuesta inmune de las plantas. Sin embargo, los trabajos destinados al estudio de vesículas rizobianas liberadas durante la simbiosis son muy escasos y limitados. Con el fin de contribuir en este estudio, las dos últimas publicaciones que se recogen en esta Tesis corresponden a dos protocolos que permiten el aislamiento y análisis de las MVs liberadas por los rizobios en diferentes etapas del proceso simbiótico: i) aislamiento de MVs de CIAT 899 en vida libre bajo la influencia de del flavonoide activador apigeinina (Ayala-García *et al.*, 2024a); ii) aislamiento de MVs del espacio peribacteroideo de los nódulos de *Phaseolus vulgaris* colonizados por CIAT 899 (Ayala-García *et al.*, 2024b).

Rhizobia are soil bacteria with the ability to fix atmospheric nitrogen (N_2) in symbiosis with leguminous plants. In this mutualistic relationship, plant provides nutrients and an optimal microenvironment, called nodule, where rhizobia carry out the biological nitrogen fixation (BNF). In return, plant takes the nitrogen as product result of the BNF. Nitrogen is one of the most important limiting elements in plant growth. Thus, rhizobium-legume symbiosis contributes to the improvement of crop yields in a natural and sustainable way in front of using of fertilizers and agrochemicals, which cause a strong environment impact.

This symbiotic process requires a high degree of specificity between the microsymbiont (the rhizobia) and the macrosymbiont (the plant). The rhizobia regulatory protein NodD is one of the keys in the recognition of these organisms in the rhizosphere. This protein senses the flavonoids present in legume root exudates and is activated in the presence of a compatible one. Once activated, it induces the expression of *nod* (nodulation) genes, which code to proteins that synthesize and secrete molecules called nodulation factors (NFs). In the rhizosphere, the NFs are recognized by specific plant receptors, which triggers the entry of the rhizobia into the root and the nodule development, where rhizobia differentiate into N_2 fixing forms.

Rhizobium tropici CIAT 899 is an excellent organism for symbiotic studies. It is a promiscuous strain, with the ability to nodulate a wide range of host plants. Also, this strain is capable to tolerate different stressful conditions, such as acidity, drought or salinity. The CIAT 899 genome has multiple copies of *nodD* (*nodD1*, *nodD2*, *nodD3*, *nodD4* and *nodD5*), an no common feature in the rhizobia. However, the most revealing feature of this rhizobium is its ability to synthesize NFs under osmotic stress conditions in a flavonoid independent manner. Genome sequencing of CIAT 899 and transcriptomic studies carried out in this bacterium have demonstrated that NFs synthesis in the presence of apigenin and under osmotic stress conditions is regulated by NodD1 and NodD2, respectively. In addition, the latest RNA-seq studies revealed that the same group of symbiotic genes are activated in the presence of both apigenin and under osmotic stress conditions. However, a set of genes located downstream of NB9, *nodD2* and *rtciat899_PB01075*, are only activated under osmotic stress.

Considering this background, one of the objectives of this doctoral Thesis is studying the role of *rtciat899_pb01075* gene, which encodes for an AraC transcriptional regulator family, named as OnfD. For this purpose, a CIAT 899 mutant in the *onfD* gene has been constructed and its symbiotic phenotype has been inspected integrating different symbiotic gene expression analyses, NF secretion studies and nodulation assays. In this manner, it has been demonstrated that OnfD is essential for the NFs synthesis under osmotic stress conditions. Furthermore, protein-protein interaction assays have shown that the NodD2 and OnfD regulators could interact together carrying out the transcriptional activation of symbiotic genes under osmotic stress. These data are shown in del Cerro *et al.*, 2020, in which the PhD candidate is first co-author (first chapter of this PhD Thesis)

Additionally, the role of each NodD protein have been studied in a scenario without the influence of the rest of the NodD regulators. For it, each *nodD* gene alone has been expressed under both its own promoter and a constitutive promoter in a quintuple *nodD* mutant background. In this way, it has been carried out expression analysis of the symbiotic genes, microscopy colonization experiments and nodulation assays. As a result, it has been demonstrated that NodD2 does not require activation by inducers such as compatible flavonoids or an osmotic stress-dependent molecule, that is, its role carrying out the expression of *nod* genes under osmotic stress conditions is a consequence of an increase of NodD2 cytoplasmic levels. Moreover, this study demonstrates that the product of *nodD2* gene overexpression of CIAT 899 can modify the host range in other rhizobia. Nevertheless, the function of NodD3, NodD4 and NodD5 proteins in symbiosis remains unclear. These data are outlined in Ayala-Garcia *et al.*, 2022, which corresponds to the second chapter of this Thesis.

Finally, the present doctoral Thesis moves away the focus from study the regulation of the symbiotic genes of CIAT 899. Nevertheless, the main objective to looking for elements that participate in the rhizobium-legume symbiosis is maintained. Thus, the last two chapters are focused on studying the role of membrane vesicles (MVs) released by rhizobia during the symbiosis. MVs are lipid nanospheres that emerge from the cell envelope. They are involved in numerous cellular processes, such as stress response, pathogenicity, nutrient and metal acquisition or horizontal transfer of genetic material. In recent years, the study of MVs secreted by pathogenic organisms and their interaction

with plants has gained prominence, which has led to know that these particles play an important role modulating the plant immune response. However, works about rhizobial MVs are scarce and limited. In order to contribute to this field, the last two publications included in this doctoral Thesis correspond to two protocols that allow the isolation and analysis of MVs released by rhizobia at different stages of the symbiotic process: i) Isolation, quantification, and visualization of extracellular membrane vesicles in rhizobia under free-living conditions (Ayala-Garcia *et al.*, 2024a); ii) Isolation of rhizobial extracellular membrane vesicles from bacteroids (Ayala-Garcia *et al.*, 2024b).

INTRODUCCIÓN

Importancia del nitrógeno

El nitrógeno forma parte de biomoléculas tan importantes para la vida como los aminoácidos, los ácidos nucleicos (ADN y ARN) o el ATP, convirtiéndose en un elemento indispensable para todos los organismos que habitan la Tierra. Este elemento, se encuentra mayoritariamente en forma de gas (N_2) constituyendo casi el 80% de la atmósfera terrestre (Moreau *et al.*, 2019; Sheoran *et al.*, 2021). Sin embargo, la mayoría de los organismos son incapaces asimilar el nitrógeno directamente de la atmósfera. Solo algunas bacterias y arqueas, que portan la enzima nitrogenasa, tienen la capacidad de convertir este nitrógeno atmosférico en amonio (NH_4^+), en un proceso natural conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN). De esta forma, el nitrógeno queda biodisponible para el resto de los organismos que habitan la tierra, entre ellos, las plantas (Galloway *et al.*, 2008).

Las plantas pueden adquirir compuestos nitrogenados a partir de diferentes fuentes: de la descomposición de la materia orgánica del suelo, mediante el uso de fertilizantes nitrogenados o como ya se ha mencionado, a través de la FBN. En el ámbito de la agricultura, el nitrógeno desempeña un papel crítico, siendo uno de los principales factores que limita el crecimiento de los cultivos y su producción (Moreau *et al.*, 2019).

En las últimas décadas, nos enfrentamos al reto de satisfacer las necesidades alimenticias de una población en crecimiento exponencial, lo que ha derivado en el uso incontrolado de fertilizantes nitrogenados con el fin maximizar el rendimiento de los cultivos. El problema radica en que el uso excesivo de estos fertilizantes genera un fuerte impacto negativo sobre el medioambiente, contribuyendo a la emisión de gases de efecto invernadero y a la contaminación de suelos y aguas, además del alto coste energético y económico que supone su producción. Por ello, encontrar alternativas al uso de fertilizantes inorgánicos es crucial para garantizar la sostenibilidad y seguridad de la producción agrícola y los ecosistemas sin comprometer las necesidades alimenticias de la población (Graham & Vance, 2000; Liu *et al.*, 2011). Así, la FBN, al tratarse de un proceso natural llevado a cabo por microorganismos presentes en el suelo, se plantea como una vía alternativa al uso de fertilizantes inorgánicos.

Entre las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, se puede discernir entre aquellas capaces de fijar el nitrógeno en vida libre, como las bacterias de los géneros *Azotobacter*,

Azospirillum, *Bacillus* o *Clostridium*, de las que lo hacen asociadas a organismos eucarióticos, como hongos o plantas. En estas últimas se encuentran las bacterias del género *Frankia*, que establecen simbiosis con plantas actinorrícicas como *Alnus*, *Myrica* o *Eleagnus*, y las cianobacterias, que pueden establecer distintas relaciones simbióticas: con hongos, dando lugar a los líquenes, con musgos (*Sphagnum* spp.), hepáticas (*Marchitaria* spp.), antocerotas (*Notothylas* spp. y *Phaeoceros* spp.), helechos (como la simbiosis *Anabaena azollae* con *Azolla* spp.), angiospermas (un ejemplo es la asociación entre plantas del género *Gunnera* spp. y la cianobacteria *Nostoc punctiforme*) y con plantas gimnospermas (como *Cyca* o *Bowenia* con distintas especies de cianobacterias de los géneros *Nostoc*, *Spirulina*, *Oscillatoria*, *Anabaena*, *Rivularia* o *Calotrrix*). Finalmente, se encuentran los rizobios, que fijan el N₂ atmosférico al establecer relaciones endosimbióticas con plantas leguminosas (Mayz-Figueroa, 2004).

El establecimiento de la simbiosis entre los rizobios y las plantas leguminosas ha sido la relación mutualista más estudiada a lo largo de los años, ya que se trata del modo de fijación de nitrógeno más efectivo, por el que se fija entre 20 y 300 Kg por hectáreas y por año, además de su enorme importancia debido al valor económico y nutricional de las plantas leguminosas (Graham & Vance, 2000). Esta familia de plantas, la *Leguminosae* o *Fabaceae*, representan una de las principales fuentes de proteína vegetal para los seres humanos y la alimentación animal en todo el mundo (Soumare *et al.*, 2020).

Historia y filogenia de los rizobios

Hace más de 2.000 años en la antigua China ya se demostró que la rotación de cultivos entre cereales y plantas leguminosas favorecía la producción del grano debido a una mejora de la fertilidad del suelo al cultivar plantas leguminosas, aunque se desconocía la explicación a este fenómeno. Fueron Hellriegel y Wilfarth, a finales del siglo XIX, quienes demostraron que los nódulos presentes en las raíces de las leguminosas eran los responsables de la fijación de nitrógeno atmosférico y de la mejora de los cultivos. Años más tarde, en 1888, el microbiólogo Martinus Willem Beijerinck aisló por primera vez una bacteria de los nódulos de *Pisum sativum* (guisante), demostrando que eran estos microorganismos los responsables de la fijación de nitrógeno. Esta bacteria fue denominada *Bacillus radicícola* y reclasificada en 1889 como *Rhizobium leguminosarum*. Es por ello, que desde entonces se conoce de forma general como rizobios a las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico aisladas de los nódulos de las plantas (Ramírez-Bahena *et al.*, 2016; Velázquez *et al.*, 2017).

A lo largo de la historia, clasificar a los rizobios ha supuesto un gran reto para los taxónomos. Los grandes avances en técnicas de caracterización bacteriana junto a los continuos aislados bacterianos de los nódulos conllevan a una continua reclasificación taxonómica (Ferraz *et al.*, 2022). En la actualidad, los rizobios se distribuyen en 8 familias, 7 pertenecen a la clase α -Proteobacteria y una a la clase β -Proteobacteria. Las bacterias de la clase α -Proteobacteria están ampliamente distribuidas geográficamente y establecen simbiosis con un amplio rango de plantas hospedadoras, mientras que las de la clase β -Proteobacteria no están tan extendidas y son más restrictivas en su rango de hospedador. En la clase α -Proteobacteria se sitúa el orden *Rhizobiales* y dentro de este orden se encuentran las familias *Rhizobiaceae*, que incluye 7 géneros; *Phyllobacteriaceae*, con 3 géneros; *Methylobacteriaceae*, con 2 géneros; y las familias de *Nitrobacteraceae*, *Brucelaceae*, *Hyphomicrobiaceae* y *Xanthobacteraceae*, que engloban un solo género. En el caso de las β -Proteobacteria se encuentra el orden *Burkholderiales* con la familia *Burkloderiaceae* y 3 géneros diferentes (Martínez-Romero, 2009). En la **Tabla 1** se clasifican los 19 géneros de rizobios y se indica el número de especies recogidas en cada uno de ellos.

Una de las últimas modificaciones taxonómicas ha sido el cambio de nomenclatura del género *Sinorhizobium* a *Ensifer*. Sin embargo, muchos autores y trabajos siguen referenciando a las especies de este género como *Sinorhizobium* (Weir, 2016).

Tabla 1. Clasificación actual de los diferentes géneros de rizobios y el número de especies que se incluyen en cada uno de ellos (Ferraz *et al.*, 2022).

<i>α-Proteobacteria</i>	
<i>Hyphomicrobiales</i> (= <i>Rhizobiales</i>)	
<i>Rhizobiaceae</i>	
<i>Agrobacterium</i>	2
<i>Allorhizobium</i>	2
<i>Ensifer</i> (= <i>Sinorhizobium</i>)	20
<i>Neorhizobium</i>	4
<i>Pararhizobium</i>	2
<i>Rhizobium</i>	49
<i>Shinella</i>	1
<i>Phyllobacteriaceae</i>	
<i>Aminobacter</i>	1
<i>Phyllobacterium</i>	4
<i>Mesorhizobium</i>	48
<i>Nitrobacteraceae</i> (= <i>Bradyrhizobiaceae</i>)	
<i>Bradyrhizobium</i>	58
<i>Methylobacteriaceae</i>	
<i>Microvirga</i>	4
<i>Methylobacterium</i>	1
<i>Brucellaceae</i>	
<i>Brucella</i> (= <i>Ochrobactrum</i>)	2
<i>Hyphomicrobiaceae</i>	
<i>Devosia</i>	1
<i>Xanthobacteraceae</i>	
<i>Azorhizobium</i>	2
<i>β-Proteobacteria</i>	
<i>Burkholderiales</i>	
<i>Burkholderiaceae</i>	

<i>Cupriavidus</i>	2
<i>Paraburkholderia</i>	22
<i>Trinickia</i>	1

La simbiosis rizobio-leguminosa

La simbiosis rizobio-leguminosa es una relación mutualista endosimbiótica en la que la planta ofrece a la bacteria nutrientes y un microambiente óptimo donde llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno (los denominados nódulos), y a cambio, la planta se beneficia asimilando el amonio resultante de la FBN con el fin de satisfacer sus requerimientos de nitrógeno (Poole *et al.*, 2018; Walker *et al.*, 2020; Cangioli *et al.*, 2022). En esta Tesis Doctoral el proceso simbiótico se va a dividir en tres etapas principales: i) síntesis y secreción de los factores de nodulación, ii) colonización de la raíz, y iii) formación del nódulo y fijación de nitrógeno atmosférico.

I. Síntesis y secreción de factores de nodulación (NFs)

El inicio de la simbiosis tiene lugar cuando los rizobios presentes en el suelo reconocen ciertos flavonoides exudados por las raíces de las plantas leguminosas (Cesco *et al.*, 2010; Hassan & Mathesius, 2012; Weston & Mathesius, 2013). En presencia de un flavonoide compatible se activa la proteína reguladora NodD de la bacteria, que actúa induciendo la expresión de los genes de nodulación, también llamados genes *nod*, mediante su unión a regiones promotoras conservadas que anteceden a estos genes, conocidas como cajas de nodulación o cajas *nod* (NBs, del inglés *nod boxes*). En la mayoría de los rizobios los genes *nod* se agrupan en un mismo plásmido, denominado plásmido simbiótico (pSym). Sin embargo, en algunas especies, como *Bradyrhizobium japonicum* o *Mesorhizobium loti*, estos genes se agrupan en islas simbióticas en el cromosoma de la bacteria (Downie, 1998). En cualquier caso, los genes *nod* codifican para proteínas encargadas de llevar a cabo la síntesis y secreción de un conjunto de moléculas específicas denominadas factores de nodulación, factores Nod (NFs, del inglés *Nod factors*) o LCOs por su naturaleza lipopéptida oligosacáridica (del inglés, *Lipo-Chitin Oligosaccharides*), (Mulligan & Long, 1985) (**Figura 1**). Así, los rizobios en presencia de un/os flavonoide/s compatible/s

sintetizan y liberan a la rizosfera, no solo un tipo, si no una mezcla de NFs que pueden variar en su estructura.

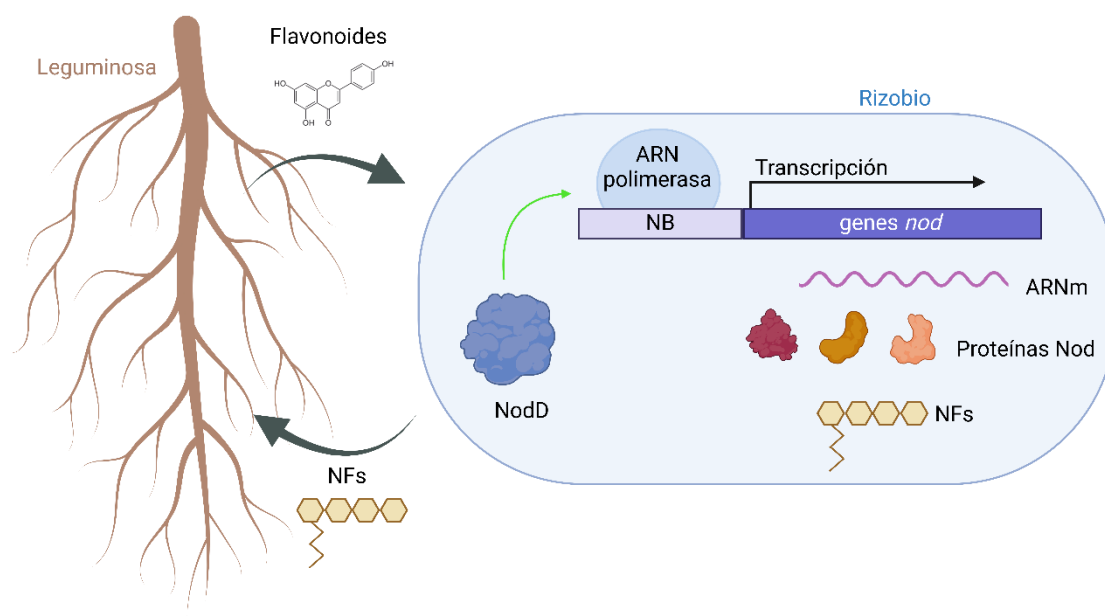


Figura 1. Primera etapa de la simbiosis rizobio-leguminosa: síntesis y secreción de los factores de nodulación.

II. Colonización de la raíz

Tras ser liberados a la rizosfera, los NFs son reconocidos por unos receptores de membrana localizados en la epidermis radicular. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores LysR, compuestos por un dominio extracelular, que media el reconocimiento del ligando, y un dominio intracelular con actividad quinasa, esencial para la transducción de la señal (Ghantasala & Roy Choudhury, 2022). Tras la unión NFs-receptor, se inicia una cascada de señalización intracelular que culmina con oscilaciones de los niveles de calcio en el núcleo de la célula vegetal (Miller *et al.*, 2013; Ghantasala & Roy Choudhury, 2022). Estas oscilaciones de Ca^{2+} se inician en las células epidérmicas de la raíz que portan los receptores y se propaga hasta las células del córtex de la planta (Esseling *et al.*, 2003; Oldroyd, 2013).

Uno de los efectos tempranos que tiene lugar tras el reconocimiento de los NFs por parte de los receptores de la planta es la curvatura de los pelos radicales, formando el llamado “cayado de pastor”, que envuelve parte de la población de los rizobios que invadirán posteriormente la raíz. Estos rizobios penetran en la raíz mediante la formación de una

estructura tubular denominada tubo de infección (IT, del inglés *Infection Thread*) (Oldroyd *et al.*, 2011). Este tubo de infección se forma tras la hidrólisis localizada del ápice de la pared celular vegetal, seguida de la invaginación de la membrana plasmática de la célula que conforma el pelo radical. A medida que se van dividiendo las bacterias en su interior, el IT se elonga y avanza hasta alcanzar las células del córtex (**Figura 2^a**) (Oldroyd *et al.*, 2011).

De forma simultánea a la formación y desarrollo de los ITs, las células del córtex sufren modificaciones moleculares con el fin de acoger a los rizobios en su interior. Se diferencian a células poliploides de gran tamaño mediante el fenómeno de endorreducción, que consiste en una modificación del ciclo celular con replicación del genoma sin llevar a cabo la división de la célula. Así, pasan a convertirse en células de gran tamaño, metabólicamente muy activas, denominadas células simbióticas y que darán lugar, posteriormente, a la formación de los nódulos radicales (Vinardell *et al.*, 2003; Mergaert *et al.*, 2006; Suzaki *et al.*, 2015). Cabe mencionar que en algunos casos, como la simbiosis entre *Azorhizobium caulinodans* y la leguminosa *Sesbania rostrata*, los nódulos se forman en el tallo de la planta (Dreyfus *et al.*, 1988).

Aunque la vía de colonización de la raíz a través de la formación de ITs es considerada la más evolucionada, existe otro mecanismo más primitivo por el que los rizobios pueden colonizar e infectar las raíces de las plantas leguminosas (Goormachtig *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2020). Se trata de una vía de entrada intercelular por la que los rizobios penetran la raíz a través de las células epidérmicas de forma independiente a la formación de ITs. Cuando este tipo de colonización entre las células de la epidermis radicular es consecuencia de las roturas ocasionadas por las raíces laterales que emergen recibe el nombre de *crack entry*, que se podría traducir al español como entrada por grietas o fisuras (**Figura 2B**) (Sprent, 2007; Acosta-Jurado *et al.*, 2019; Montiel *et al.*, 2021). El mecanismo de infección intercelular puede ser dependiente de NFs, como es el caso de la interacción simbiótica entre *Sinorhizobium fredii* HH103 y la leguminosa *Lotus burttii* (Madsen *et al.*, 2010; Acosta-Jurado *et al.*, 2016a) o, como ocurre en especies de *Bradyrhizobium*, de forma independiente a la presencia de estas moléculas (Giraud *et al.*, 2007; Deakin *et al.*, 2009).

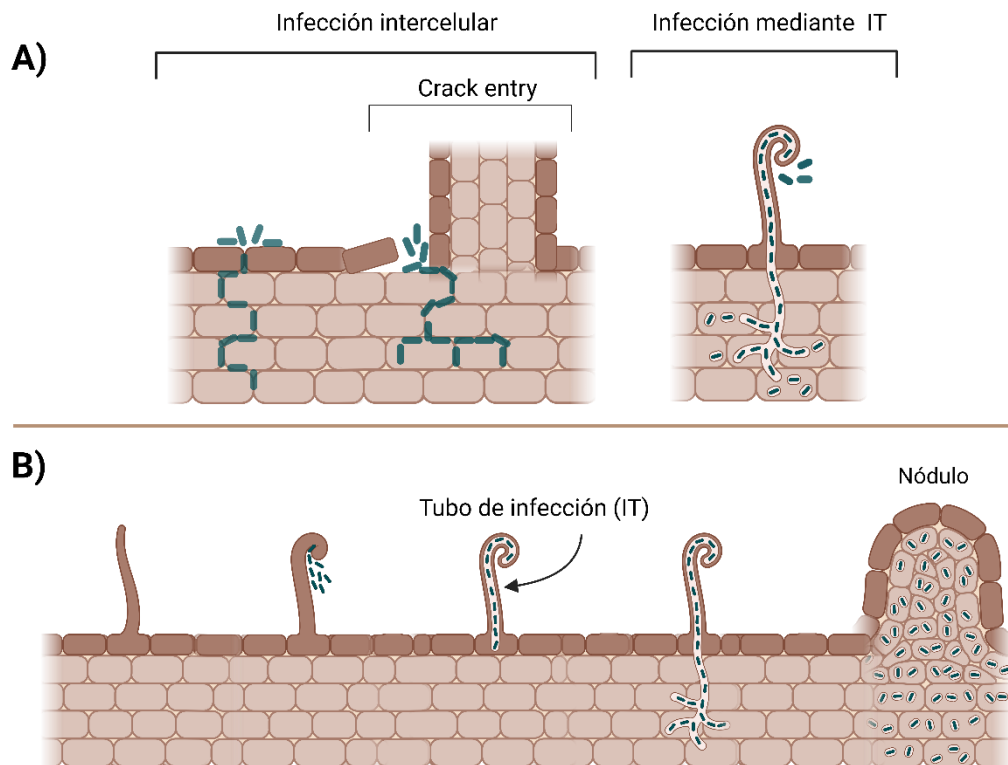


Figura 2. Segunda etapa de la simbiosis rizobio-leguminosa: Colonización de la raíz. **(A)** Tipos de colonización: vía intercelular y mediante ITs. **(B)** Desarrollo del IT.

III. Formación del nódulo y fijación de nitrógeno atmosférico

Cuando los rizobios alcanzan las células simbióticas son liberados en su interior, pudiendo acoger a un grupo de bacterias o solo una de ellas en un mismo evento de endocitosis. Como resultado, los rizobios quedan rodeados por la membrana de la célula vegetal, que pasa a denominarse membrana peribacteroidea o membrana simbiosomal. En este punto, los rizobios se diferencian en formas capaces de fijar nitrógeno atmosférico que reciben el nombre de bacteroides. Al conjunto de bacteroides y a la membrana peribacteroidea que los engloba recibe el término de simbiosoma y el espacio existente entre ambos, espacio peribacteroideo o espacio simbiosomal, que va a actuar como interfaz en el intercambio de metabolitos entre la planta y la bacteria (**Figura 3**) (Mergaert *et al.*, 2006; Oldroyd, 2013).

La forma y la anatomía del nódulo dependen exclusivamente de la planta (Sprent, 2007). Se puede hablar, principalmente, de dos tipos de morfología de nódulos: los nódulos determinados y los nódulos indeterminados (Gage, 2004; Patriarca *et al.*, 2004). Los

nódulos determinados tienen morfología esférica y son típicos de leguminosas de climas tropicales y subtropicales como *Lotus japonicus*, *Phaseolus vulgaris* (judía) o *Glycine max* (soja), mientras que los nódulos indeterminados tienen morfología cilíndrica y son típicos de leguminosas de climas templados como *Medicago sativa* (alfalfa), *Pisum sativum* (guisante) o *Trifolium spp.* (tréboles). El primordio de los nódulos determinados se origina en el córtex externo y da lugar a un meristemo cuya actividad es transitoria, de modo que genera una masa esférica que alberga a rizobios que se diferencian de forma simultánea (Ferguson *et al.*, 2010). En los nódulos indeterminados, el primordio se origina en el córtex interno de la raíz y da lugar a un meristemo apical persistente, de modo que el nódulo adopta forma cilíndrica donde se pueden diferenciar distintas zonas: zona de invasión del rizobio, zona de fijación activa de N₂ y zona de senescencia (Udvardi & Poole, 2013; Mergaert *et al.*, 2006; Ferguson *et al.*, 2010).

En cualquier caso, la diferenciación de los rizobios a bacteroides conlleva numerosos cambios a nivel de transcriptoma y proteoma. Entre ellos, se reduce la transcripción de genes implicados en el crecimiento celular como aquellos que participan en la síntesis de proteínas ribosómicas, aminoácidos o en la replicación del ADN. Por el contrario, se activa la transcripción de los genes implicados en la formación y regulación del complejo nitrogenasa, como los genes *nif* y *fix* (Poole & Ledermann, 2022). La enzima nitrogenasa, encargada de realizar la conversión del N₂ a amonio, es altamente sensible a la presencia de oxígeno, por ello, en el interior del nódulo se mantiene un ambiente de microaerobiosis que garantiza la actividad de esta enzima (Hoffman *et al.*, 2014; Poole *et al.*, 2018). En cuanto al intercambio de señales en los nódulos, la célula vegetal proporciona a los bacteroides ácidos dicarboxílicos como fuente de carbono (principalmente en forma de L-malato y succinato), además de metales o ligandos que resultan claves para el correcto funcionamiento de la enzima nitrogenasa, como es el caso del homocitrato. A cambio, la bacteria cede a la planta alanina y amonio como productos resultantes de la fijación del nitrógeno atmosférico.

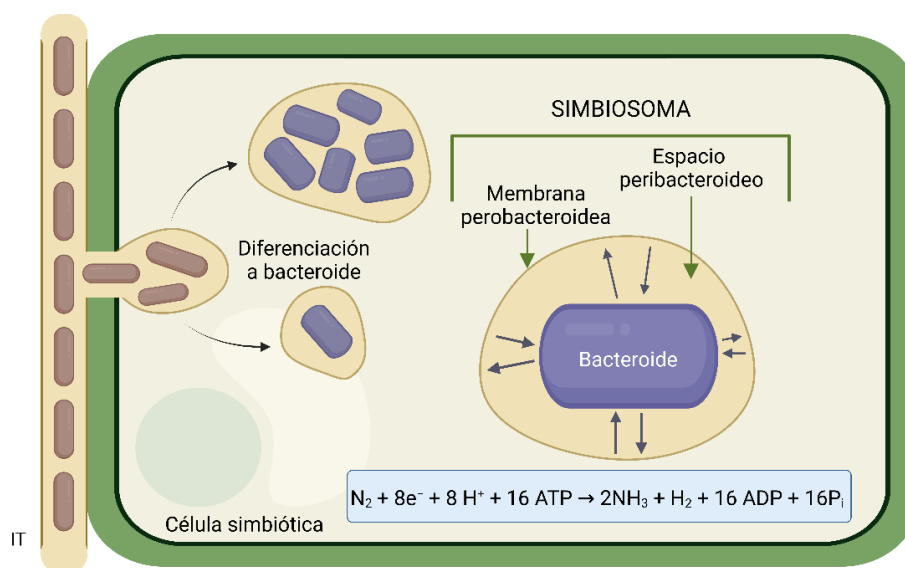


Figura 3. Tercera etapa de la simbiosis rizobio-leguminosa: Desarrollo del nódulo y fijación del nitrógeno atmosférico.

Factores determinantes en el establecimiento de la simbiosis

Los flavonoides

Los flavonoides son metabolitos secundarios, de naturaleza fenólica y bajo peso molecular que son exudados por las raíces de las plantas leguminosas junto a otras moléculas de diferente naturaleza. Se han descrito alrededor de 10.000 variantes estructurales de estas moléculas, que se acumulan en los extremos de los pelos radicales y actúan como quimioatrayente de los rizobios e inductores de los genes *nod* (Panche *et al.*, 2016; Skorupska *et al.*, 2017; Shumilina *et al.*, 2023).

Estos compuestos fenólicos son biológicamente activos a concentraciones muy bajas, pudiendo activar la síntesis de los factores de nodulación en la bacteria a concentraciones inferiores a 10^{-6} M (Schlaman *et al.*, 1998). Sin embargo, no se ha encontrado en la naturaleza un flavonoide que actúe de forma general induciendo la biosíntesis de NFs en todos los rizobios. Así, por ejemplo, el flavonoide genisteína induce la transcripción de los genes de nodulación en *S. fredii* pero no en *Rhizobium tropici* (Hungria *et al.*, 1991a;

Folch-Mallol *et al.*, 1998), mientras que, el flavonoide apigenina induce la síntesis de NFs en *R. tropici*, sin tener tal efecto en *S. fredii* (Morón *et al.*, 2005).

Los factores Nod (NFs)

En respuesta a los exudados liberados por la planta, cada rizobio produce no sólo un tipo de NF sino un coctel que pueden contener desde 2 hasta incluso más de 60 variantes de estas moléculas, que actúan conjuntamente para inducir una respuesta en la planta hospedadora (Minami *et al.*, 1996; Spink, 2000). Los factores Nod o LCOs están constituidos por un esqueleto oligomérico de 2 a 6 subunidades de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) unidas por enlaces β -1, 4, que portan un ácido graso en su extremo no reductor y que pueden presentar diversos radicales en su estructura (D'Haese & Holsters, 2002). En la **Figura 4** se muestra la estructura química simplificada de una molécula de NF y algunos de los sustituyentes más comunes.

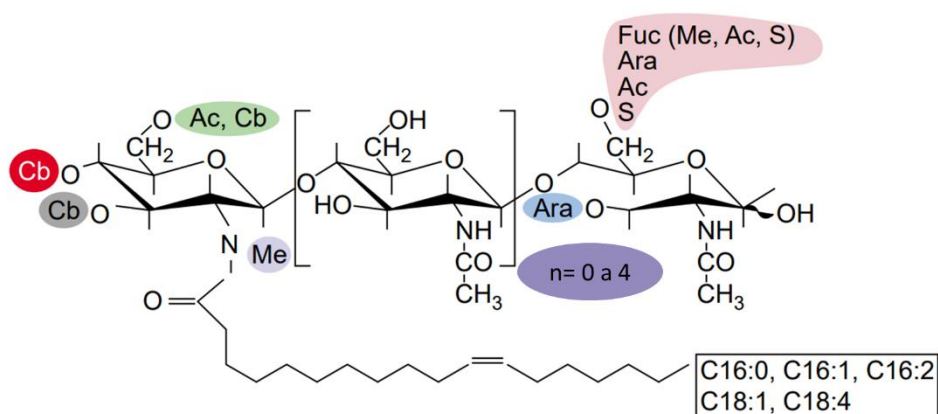


Figura 4. Estructura química general de un factor Nod, algunos de los sustituyentes identificados en diferentes especies de rizobio (círculos en color) y ejemplos de las variantes que pueden conformar la cadena de ácido graso. Abreviaturas: **Ac**, grupo acetilo; **Ara**, arabinosilo; **Cb**, carbonilo; **Fuc**, fucosilo; **Me**, metilo; **S**, sulfato. Imagen tomada y modificada de Cullimore *et al.*, 2001.

Las proteínas que codifican los genes de nodulación *noda*, *nodb* y *nodc* son conocidos como genes *nod* comunes, ya que son las enzimas responsables de la biosíntesis del esqueleto oligomérico de los NFs y están presentes en todos los rizobios. En primer lugar, la proteína NodC lleva a cabo la oligomerización de las subunidades de *N*-acetil-D-glucosamina. Posteriormente, NodB desacetila el azúcar terminal del extremo no

reductor, y finalmente la proteína con actividad aciltransferasa NodA incorpora un ácido graso en esa misma posición (Spaink, 2000; D’Haeze & Holsters, 2002). La cadena que constituye este ácido graso puede variar en longitud, número y posición de insaturaciones que presente (Ghantasala, & Roy Choudhury, 2022). Una vez constituido el esqueleto principal de la molécula, otras enzimas se encargan de posicionar diferentes decoraciones en su estructura. Estas enzimas son codificadas por diferentes genes de nodulación, los denominados genes *nod* específicos, ya que pueden variar entre las diferentes especies de rizobios (Lindstrom & Mousavi, 2019). Por ejemplo, los productos de los genes *nodHPQ* de *R. tropici* están involucrados en la sulfatación del extremo reductor de los NFs (Folch-Mallol *et al.*, 1996), mientras que la proteína NodZ de *S. fredii* sintetiza e incorpora grupos fucosilos al esqueleto de sus NFs (Lamrabet *et al.*, 1999). En la **Tabla 2** se muestran algunos de los genes implicados en la ruta de síntesis y secreción de los NFs y su función correspondiente.

De esta forma, existe una gran variabilidad de NFs según su longitud, el tipo de ácido graso que porta, así como los diferentes sustituyentes que presentan, dando lugar a uno de los determinantes más importantes en la especificidad rizobio-leguminosa (D’Haeze & Holsters, 2002). Un caso claro es el grupo sulfato presente en el extremo no reductor de los NFs liberados por *Sinorhizobium meliloti*. Este radical parece ser esencial para establecer simbiosis efectiva con su planta hospedadora *Medicago sativa*, ya que mutaciones en el gen *nodH*, implicado en la incorporación de este grupo en los NFs impide la nodulación de la bacteria con esta planta (Roche *et al.*, 1991).

Tabla 2. Algunos de los genes de nodulación mejores caracterizados implicados en la síntesis de NFs en los rizobios (Perret *et al.*, 2000; Vance, 2002).

Gen	Función de la proteína que codifica
<i>nodA</i>	Aciltransferasa
<i>nodB</i>	Quitina desacetilasa
<i>nodC</i>	<i>N</i> -acetilglucosamina transferasa
<i>nodEF</i>	Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados
<i>nodH</i>	Sulfotransferasa
<i>nodL, nodX, nolL</i>	<i>O</i> -acetiltransferasa
<i>nodM</i>	Glucosamina sintasa

<i>nodPQ</i>	Síntesis de sulfato en forma activa
<i>nodS</i>	<i>N</i> -metiltransferasa
<i>nodU, nolO</i>	<i>O</i> -carbamoil transferasa
<i>nodZ</i>	Fucosil transferasa
<i>nolK</i>	Epimerasa implicada en la síntesis de fucosa
<i>nolR</i>	Represor de genes de nodulación
<i>nodD</i>	Regulador transcripcional de genes de nodulación

Reguladores transcripcionales en simbiosis

La presencia de abundantes reguladores transcripcionales en bacterias permite la optimización de la expresión génica y la respuesta y adaptación a diferentes condiciones ambientales. Así, la presencia de un amplio repertorio de proteínas reguladoras supone una característica ventajosa de los organismos de vida libre y patógenos oportunistas frente a los organismos intracelulares que viven en ambientes muy controlados y estables. Entre los reguladores transcripcionales más abundantes en bacterias se encuentran las familias de reguladores LysR, TetR/AcrR, AraC/XylS, y Lrp (Kotecka *et al.*, 2021).

En esta Tesis cobrará protagonismo el estudio de los reguladores transcripcionales pertenecientes a las familias LysR y AraC/XylS.

La familia de reguladores LysR: el regulador NodD

La proteína NodD, que juega un papel fundamental en simbiosis regulando la expresión de los genes simbióticos, pertenece a la familia de reguladores transcripcionales LysR. En organismos procariotas se encuentran numerosos reguladores que pertenecen a esta familia, ya que además de en simbiosis, están implicados en la regulación de otros procesos biológicos como la virulencia, la movilidad, la percepción de *quorum* o la regulación del metabolismo celular (Maddocks & Oyston., 2008).

Las proteínas de tipo LysR están constituidas por aproximadamente 300 aminoácidos y dos dominios principales: el dominio amino-terminal, altamente conservado, formado por un motivo hélice-giro-hélice que se encarga de la unión al ADN; y el dominio carboxilo-terminal, menos conservado, que participa en el reconocimiento del ligando y en la formación de complejos, que pueden ir desde homodímeros a homooctámeros (Schell, 1993; Kostiuk *et al.*, 2013; Peck *et al.*, 2013). En cualquier caso, estos reguladores

transcripcionales, una vez activados en presencia del ligando, actúan uniéndose a regiones promotoras altamente conservadas, que en su mayoría son independientes de los promotores propios de los genes que regula. En el caso del regulador NodD de rizobios, estas regiones promotoras corresponden a las ya mencionadas cajas de nodulación (NBs), donde se une la proteína NodD para activar la expresión de los genes *nod*.

Aunque inicialmente los reguladores de la familia LysR se identificaron como activadores de la transcripción, en la actualidad se sabe que pueden actuar activando o reprimiendo la transcripción de los genes a los que regula (Maddocks & Oyston., 2008). Por ejemplo, la proteína NodD2 de *S. fredii* NGR234 es necesaria para la formación de nódulos fijadores de N₂, pero al mismo tiempo, actúa como represor de los genes *nodABC*. En el caso de *S. fredii* HH103 la mutación en el gen *nodD2* conlleva a la síntesis de una mayor cantidad de NFs por activación de los genes *nod*, lo que permite a este rizobio establecer simbiosis efectiva con *L. japonicus*, planta en la que la estirpe silvestre no es capaz de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno (Fellay *et al.*, 1998; Kobayashi *et al.*, 2004; Acosta-Jurado *et al.*, 2019).

A pesar de que la proteína NodD aún no se ha conseguido cristalografar, estudios de mutagénesis puntuales y aproximaciones bioinformáticas a partir de la cristalografía de otras proteínas similares, han permitido generar modelos predictivos de la estructura tridimensional del regulador NodD (**Figura 5**) (Peck *et al.*, 2013). A día de hoy, no hay evidencias bioquímicas que demuestren que la activación de la proteína NodD en presencia de un flavonoide inductor sea por la interacción física entre ambos componentes. De hecho, no se ha descrito aún un flavonoide activador del regulador NodD de *M. loti*, o como en el caso del regulador NodD2 de *R. tropici* CIAT 899, que actúa activando la transcripción de los genes de nodulación y síntesis de NFs en ausencia de flavonoides, bajo una condición de estrés osmótico en el medio (Kelly *et al.*, 2018; del Cerro *et al.*, 2017). Estos datos llevan a considerar que existan otras moléculas o factores que medien la activación de los reguladores NodD y que el proceso de regulación en las primeras etapas de la simbiosis sea más complejo de lo que se conoce hasta el momento.

La proteína NodD se ha identificado en todas las estirpes rizobianas, sin embargo, el número de copias del gen *nodD* pueden variar desde uno a cinco según la especie (Spaink, 2000; Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). Por ejemplo, la especie de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* posee una sola copia del gen *nodD*, mientras que las diferentes estirpes de *S. fredii* poseen dos versiones de este gen (Vinardell *et al.*, 2015). Por otra parte, distintas cepas de *R. tropici* portan 5 copias de *nodD* en su genoma (van Rhijn *et al.*, 1993).

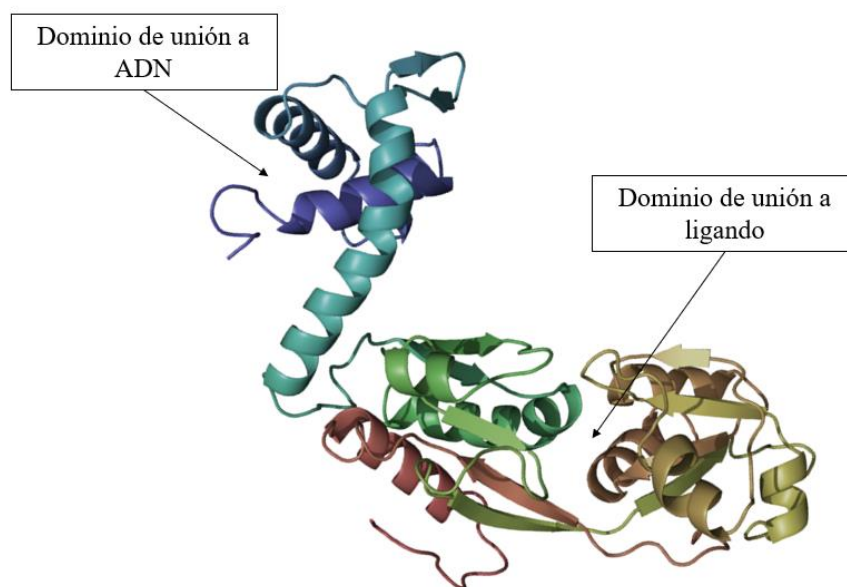


Figura 5. Modelo estructural de la proteína reguladora NodD1 de *R. tropici* CIAT 899. Imagen elaborada en Phyre² (Protein Homology/analogy Recognition Engine V 2.0) (Kelley *et al.*, 2015).

La familia de reguladores AraC/XylS

La familia de reguladores transcripcionales de tipo AraC es otro abundante grupo de reguladores transcripcionales presentes en bacterias, que en su mayoría actúan como activadores de la transcripción (Gallegos *et al.*, 1997). Estas proteínas se caracterizan por presentar un dominio carboxilo-terminal altamente conservado, conformado por dos motivos hélice-giro-hélice, responsable de la unión al ADN, y un dominio amino-terminal, más variable, implicado en el reconocimiento del ligando y en la oligomerización de la proteína (Yang *et al.*, 2011).

El regulador transcripcional perteneciente a esta familia y que ha sido mejor caracterizado es el activador/represor transcripcional AraC de *Escherichia coli*, que regula al operón *araBAD* implicado en el metabolismo de la L-arabinosa, y cuya activación depende de la presencia de este mismo azúcar en el medio. En la región del operón *araBAD* se localizan 3 regiones de reconocimiento de AraC: los denominados sitios I1 e I2, localizados próximos al lugar de unión de la ARN polimerasa y, un poco más distante, la región O2 (**Figura 6**). En ausencia de arabinosa, el dímero AraC está unido a las regiones I1 y O2, causando la formación un *loop* o lazo en el ADN que impide la unión de la ARN polimerasa a la región promotora del operón *araBAD* y, por tanto, su expresión. Cuando la arabinosa está presente en el medio se une al dominio de reconocimiento del ligando de la proteína AraC, provocando un cambio conformacional del homodímero que pasa a ocupar las regiones I1 e I2. Este cambio de posición desencadena la disipación del *loop* de ADN, favoreciendo la unión de la ARN polimerasa a la región promotora y por consiguiente la transcripción de los genes que forman el operón (Seabold & Schleif, 1998). En la **Figura 6** se muestra un modelo general del modo de acción de los reguladores de la familia AraC.

La activación y cambio conformacional de estos reguladores viene dado en su mayoría por la unión a pequeños compuestos orgánicos, en su mayoría azúcares, como el caso descrito anteriormente del regulador AraC de *E. coli*. Aunque también pueden reconocer aminoácidos y a sus derivados, como el regulador SouR de *Pseudomonas aeruginosa*, cuya activación depende de la unión de N-metilglicina (sarcosina), o incluso, reconocer otras moléculas pequeñas como la urea, ligando de unión al regulador UreR de *Providencia stuartii* (Kotecka *et al.*, 2021).

Los reguladores de la familia AraC controlan diversas funciones celulares, siendo algunos de los ejemplos más estudiados el regulador GapR, que controla el metabolismo del carbono en *Streptomyces aureofaciens* activando la transcripción del gen *gao*, que codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogena; ExA, que regula la expresión de los genes del sistema de secreción tipo III en *P. aeruginosa*; la proteína OpiA que media la respuestas a estrés en *Erwinia amylovora* o el regulador QsvR de *Vibrio parahaemolyticus*, que modula el fenómeno de percepción de *quorum* y la virulencia en esta bacteria (Kotecka *et al.*, 2021)

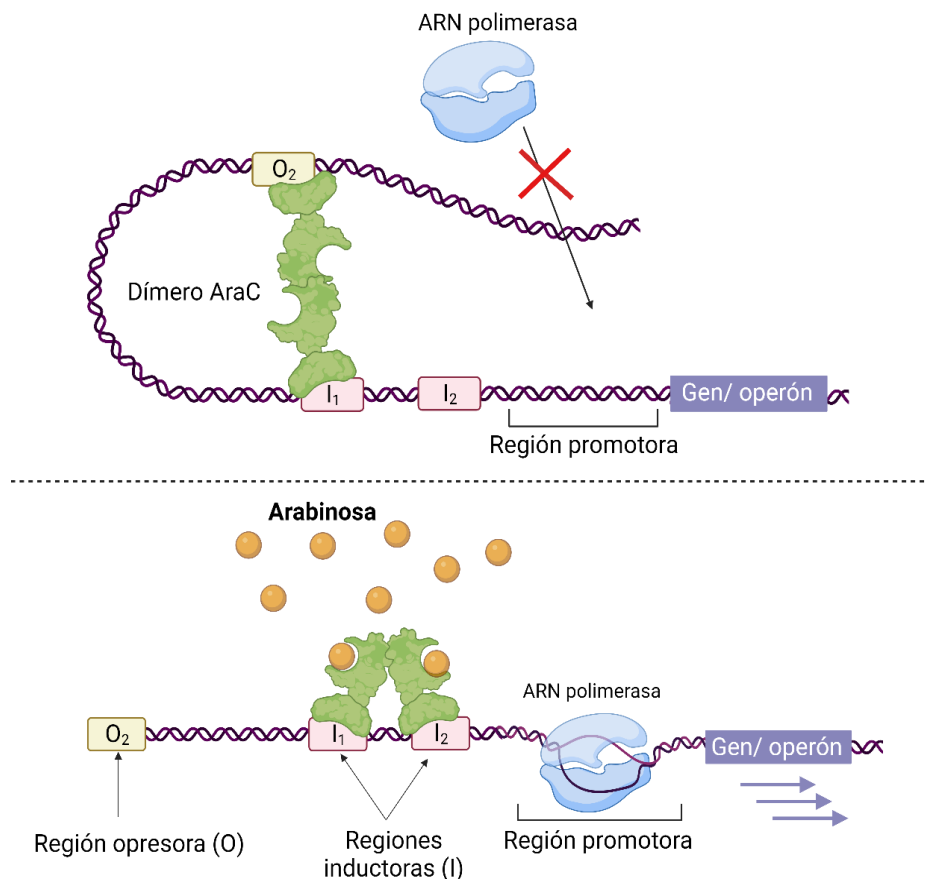


Figura 6. Modelo general de actuación de los reguladores transcripcionales de la familia AraC/XylS.

A pesar de ser muy abundantes en bacterias y participar en diversos procesos biológicos, hasta la fecha, solo se ha descrito una proteína de la familia AraC con implicación directa en la simbiosis rizobio-leguminosa. Se trata del regulador para el que codifica el gen *orf816* de la estirpe BR816 de *Rhizobium* sp. Cuando *orf816* junto al gen *nodD3* que lo antecede, se expresan de forma heteróloga en un mutante del gen *nodD1* de *S. fredii* NGR234 mejora la habilidad simbiótica de esta estirpe para nodular en *P. vulgaris* a niveles superiores de lo que resulta la complementación única de *nodD3* (Vlassak *et al.*, 1998). Curiosamente, la estirpe *R. tropici* CIAT 899 presenta en su genoma hasta 21 genes que codifican para reguladores transcripcionales pertenecientes a la familia AraC y cuatro de ellos se localizan en el plásmido simbiótico, por lo que no sería sorprendente que los reguladores de esta familia jugasen un papel importante en simbiosis (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012).

Otros determinantes simbióticos

Aunque esta Tesis Doctoral no se centre de forma explícita en ellos, existen otros factores que van a determinar el grado del éxito simbiótico, como son los polisacáridos de superficie bacteriana, la movilidad de los rizobios, la formación de biopelículas, el fenómeno de percepción de *quorum*, los sistemas de secreción bacterianos o la síntesis de ácido indol acético (AIA), entre otros. (**Figura 7**).

Polisacáridos de superficie bacteriana

Los polisacáridos de superficie de las bacterias actúan como señales moleculares durante la simbiosis y como herramienta de protección frente a los sistemas de defensa de la planta (Downie, 2010). Se han descrito diferentes tipos de polisacáridos en rizobios: los exopolisacáridos (EPS), el polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS), los lipopolisacáridos (LPS) y los glucanos cíclicos (CG) (Alías-Villegas *et al.*, 2022).

Numerosos estudios demuestran la importancia de estos azúcares en el reconocimiento planta-microorganismo. En el caso de *S. fredii* HH103, la activación de los genes de nodulación en presencia del flavonoide genisteína reduce la cantidad de KPS y promueve la síntesis de un nuevo tipo de LPS, modelando así la superficie celular de este rizobio en los primeros estadios de la simbiosis (Acosta-jurado *et al.*, 2016b). También, en esta misma estirpe rizobiana, la producción de EPS se reprime en presencia de un flavonoide inductor a través de la proteína reguladora NodD1, y es un proceso que se requiere para una simbiosis optima con sus plantas hospedadoras (Acosta-jurado *et al.*, 2016b). Sin embargo, esta parece ser la excepción, ya que el EPS es crucial para el éxito simbiótico en numerosos rizobios, especialmente en aquellos con un estrecho rango de hospedador, como *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, y *M. loti* (Acosta-Jurado *et al.*, 2020). En *S. meliloti* se ha demostrado que mutantes deficientes en la síntesis de EPS se ven comprometidos a la hora de desencadenar la curvatura de los pelos radicales y la formación de los tubos de infección en alfalfa (Pellock *et al.*, 2000). De hecho, se ha identificado a una familia de proteínas receptoras de oligosacáridos en plantas leguminosas, los receptores EPR3, que mediante su unión a los EPS, facilitan la infección epidérmica de los rizobios, (Kawaharada *et al.*, 2017; Wong *et al.*, 2020; Acosta-Jurado *et al.*, 2021).

Movilidad bacteriana

Los rizobios se pueden mover usando diferentes mecanismos. El tipo de movilidad más estudiada es la de tipo *swimming*, que permite a la bacteria moverse en medios acuosos mediante el movimiento del flagelo. No obstante, al igual que otras muchas bacterias, los rizobios pueden desplazarse sobre diferentes superficies usando otros mecanismos de movilidad, que pueden ser dependientes o independientes del flagelo (Mattingly *et al.*, 2018; Alías-Villegas *et al.*, 2022; Brito-Santana *et al.*, 2023). La movilidad de los rizobios no es esencial para el establecimiento de la simbiosis, pero sí afecta a la eficiencia del proceso. Numerosos estudios han determinado que mutantes rizobianos afectados en el flagelo presentan defectos a la hora de colonizar las raíces, retrasos en la nodulación y/o reducción la capacidad competitiva de la bacteria (Alías-Villegas *et al.*, 2022). De hecho, Fournier y colaboradores (2008) propusieron que el avance y desarrollo de los tubos de infección viene dado por la movilidad independiente del flagelo de las bacterias combinando con la división celular de los rizobios en el interior del IT. Curiosamente, un estudio reciente ha revelado que la maquinaria de ensamblaje flagelar es importante para el correcto funcionamiento de los bacteroides de *R. leguminosarum* en nódulos de *Pisum sativum* (Wheatley *et al.*, 2020).

Percepción de *quorum*

La percepción de *quorum* (QS, del inglés *Quorum Sensing*) se define como un modo de regulación génica coordinado en respuesta a cambios en la densidad de una población bacteriana, en el que participan pequeñas moléculas señales denominadas autoinductores (AIs) (Phour *et al.*, 2020; Miller & Bassler, 2001). Los genes regulados por QS están implicados en cambios en la fisiología de la población bacteriana, modificando su comportamiento global. Por ejemplo, los sistemas de QS regulan a genes que participan en la formación de biopelículas o *biofilms*, producción de EPS, movilidad bacteriana, virulencia o transferencia de material genético, siendo muchos de estos procesos decisivos para el correcto establecimiento de la simbiosis (Pérez-Montaña *et al.*, 2014). De hecho, estos sistemas de comunicación bacteriana pueden establecerse incluso entre las poblaciones de bacterias presentes en los suelos a nivel intra e interespecífico. Así, se ha demostrado que la coinoculación de *B. japonicum* y *Azospirillum brasilense* en soja incrementa la biomasa de la planta debido a la comunicación interespecífica mediada por

QS, ya que en ausencia de las moléculas que median este proceso no se produce tal efecto (Fagotti *et al.*, 2019).

Formación de biopelículas

La formación de biopelículas o *biofilms* es un modo de vida bacteriano en el que las células se agrupan y segregan una matriz extracelular de polisacáridos desarrollando una estructura tridimensional con el fin de colonizar diferentes hábitats y superficies (Fuqua *et al.*, 1994; Miller & Bassler, 2001). En la naturaleza, la mayoría de las poblaciones bacterianas se encuentran formando estas biopelículas ya que favorece la estabilidad de la comunidad bacteriana, la comunicación y el intercambio de señales entre sus individuos y entre estos con el entorno (Stoodley *et al.*, 2002). Además, actúa como barrera de protección frente a antibióticos o sustancias de defensa producidos por otros organismos, y contra diferentes factores ambientales como la radiación, cambios de pH, estrés osmótico o la desecación (Gilbert *et al.*, 1997; Janczarek, 2011).

Los rizobios se adhieren a los pelos radicales formando una biopelícula como paso previo a la colonización de la raíz (Villegas *et al.*, 2022). Aún no se conoce muy bien los mecanismos reguladores de la formación de las biopelículas en los rizobios pero, si sabemos que la perturbación de este fenómeno repercute en el establecimiento de la simbiosis. En *S. meliloti* se ha observado que los propios NFs pueden formar parte de la matriz que conforma la biopelícula, siendo esenciales para la formación de la estructura tridimensional de la misma y necesaria para el establecimiento de la interacción simbiótica (Fujishige *et al.*, 2006). De la misma manera, en la estirpe SMH12 de *S. fredii* la formación de biopelículas se potencia en presencia de flavonoides inductores, siendo crucial para la colonización radicular y para establecer simbiosis óptima con soja (Pérez-Montaña *et al.*, 2014).

Síntesis de ácido indol acético

Aunque originalmente la producción ácido indol acético (AIA) se relacionaba con eventos de patogenicidad, se ha demostrado que muchos rizobios tienen la capacidad de sintetizar esta fitohormona, que promueve en la planta el desarrollo de raíces laterales y adventicias, entre otras funciones (Jameson, 2000). De hecho, la producción de AIA en rizobios se incrementa en presencia de determinados flavonoides (Prinsen *et al.*, 1991). En *S. fredii* NGR234 se ha identificado un operón relacionado con la síntesis de AIA

(conformado por los genes *y4wEFG*), situado bajo el control de una NB, que se activa transcripcionalmente en presencia del flavonoide inductor daidzeína (Theunis *et al.*, 2004).

En *R. tropici* CIAT 899, los genes de síntesis de AIA también se localizan bajo el control de una NB y no solo se inducen en presencia del flavonoide inductor apigenina, sino que también se activan bajo condiciones de estrés osmótico, indicando que la producción AIA está íntimamente ligada a la síntesis de NFs y a la simbiosis (Pérez-Montaña *et al.*, 2016; Tullio *et al.*, 2019).

Sistemas de secreción bacterianos

La comunicación de las bacterias con su entorno es clave para la supervivencia celular. En las paredes bacterianas, además de transportadores de membrana, se localizan numerosos sistemas de secreción, siendo los más relevantes los sistemas de secreción de tipo I (TISS, del inglés *Type I secretion system*), T2SS, T3SS, T4SS, T5SS, T6SS y T7SS. Estos sistemas se pueden clasificar en dos grandes grupos: aquellos que transportan proteínas y/o diferentes compuestos al medio extracelular (los T1SS, T2SS, T5SS y T7SS) y los que transportan proteínas efectoras hacia el citosol de células dianas (los T3SS, T4SS, y T6SS) (Nelson *et al.*, 2015). Este último grupo está ampliamente representado en muchos rizobios, y aunque muchos de estos sistemas de secreción no sean esenciales en simbiosis y algunos de ellos pueden estar involucrados en la eficiencia simbiótica y en la determinación del rango de hospedador mediante la liberación de proteínas efectoras al citosol de la célula vegetal (Soto *et al.*, 2006; Fauvart & Michiels, 2008; Sugawara *et al.*, 2013; López-Baena *et al.*, 2016). Por ejemplo, *S. fredii* HH103 cuenta con un T3SS que, al inactivarse, reduce la capacidad de nodular en su hospedador natural *G. max*, afectando en los primeros estadios del proceso, lo que indica que este ensamblado proteico podría tener un papel importante en la supresión de las respuestas defensivas de la planta. Sin embargo, los mutantes de HH103 afectados en el T3SS mejoran distintos parámetros simbióticos en asociación con *Erythrina variegata* y desarrollan nódulos fijadores en *L. japonicus*, leguminosa en la que la estirpe parental no es capaz de formar este tipo de nódulos efectivos (López-Baena *et al.*, 2008; Jiménez-Guerrero *et al.*, 2015; Jiménez-Guerrero *et al.*, 2020).

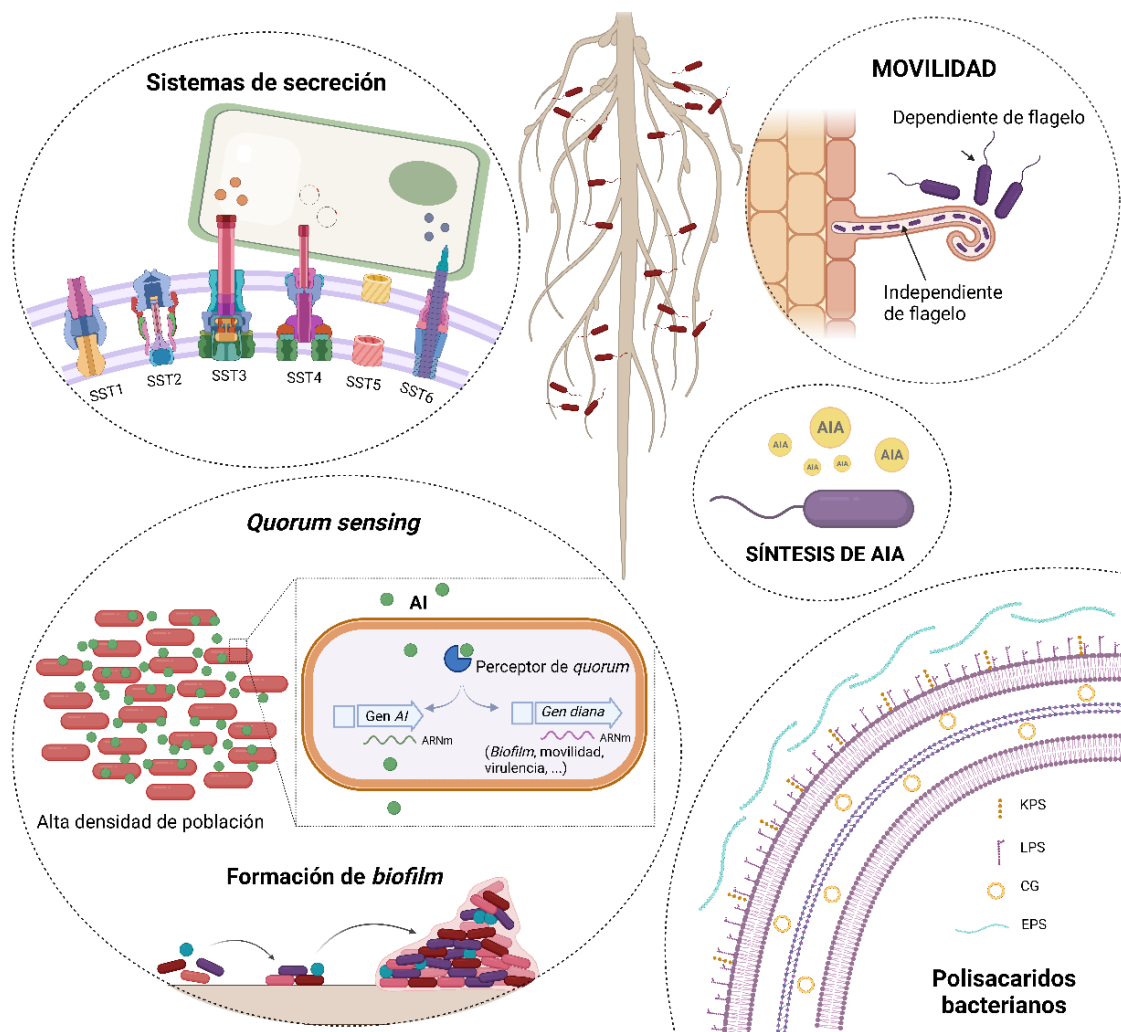


Figura 7. Otros determinantes importantes en el establecimiento de la simbiosis: movilidad bacteriana, polisacáridos bacterianos, *Quorum sensing* y formación de *biofilm*, síntesis de ácido indol acético (AIA) y sistemas de secreción bacterianos. Genes no van en cursiva en la parte de QS

EL HUÉSPED: *Rhizobium tropici* CIAT 899

La cepa CIAT 899 de *R. tropici* ha sido el organismo de estudio utilizado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Este rizobio fue aislado por primera vez de los nódulos de la leguminosa *P. vulgaris*, judía, en suelos de Colombia, por el microbiólogo Peter Graham cuando trabajaba en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), de ahí su nombre. (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Gomes *et al.*, 2015).

R. tropici CIAT 899 es una estirpe promiscua, es decir, tiene la habilidad de nodular a un amplio rango de plantas hospedadoras, y destaca por la capacidad de tolerar diferentes tipos de estreses abióticos, como el bajo pH de los suelos, las altas temperaturas, el estrés salino o la presencia de metales pesados en el medio. Esto, convierte a CIAT 899 en un excelente organismo modelo para los estudios simbióticos en condiciones medioambientales extremas (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Graham *et al.*, 1994; Nogales *et al.*, 2002; Vinuesa *et al.*, 2003).

En cuanto a su filogenia, se trata de una α -*Proteobacteria* que pertenece al género *Rhizobium* dentro de la familia de las *Rhizobiaceae*. En la **Figura 8** se muestra un árbol filogenético basado en la secuenciación del ARN ribosómico 16S, donde se sitúa CIAT 899 y las estirpes más próximas a ella (Gomes *et al.*, 2015). *Rhizobium freirei* PRF 81 es la estirpe más cercana a CIAT 899. De hecho, ambos organismos tienen un interés especial debido a su elevada capacidad de fijar N₂ en simbiosis con sus plantas hospedadoras, motivo por el se comercializan como inoculantes de *P. vulgaris* en suelos de Brasil. La secuenciación de sus genomas permitió demostrar que ambas estirpes presentan un plásmido simbiótico (pSym) que son prácticamente idénticos en sus secuencias, lo que explicaría la alta similitud de los rasgos simbióticos de estos rizobios (Gomes *et al.*, 2015). Además, este hecho dio lugar a la aparición de la simbiovariedad *tropici*, haciendo referencia el término simbiovariedad al grupo de rizobios que portan el mismo plásmido simbiótico. El grupo que componen la simbiovariedad *tropici* ha estado en continuo crecimiento en los últimos años debido al aislamiento y secuenciación de nuevos rizobios. Por ejemplo, la secuenciación de las estirpes CFN 299 y CPAO 29.8 de *Rhizobium leucaenae* ha mostrado que sus plásmidos simbióticos presentan una identidad superior al 99% con el plásmido simbiótico de CIAT 899, y por tanto, han sido incluidas dentro de la misma simbiovariedad (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2016).

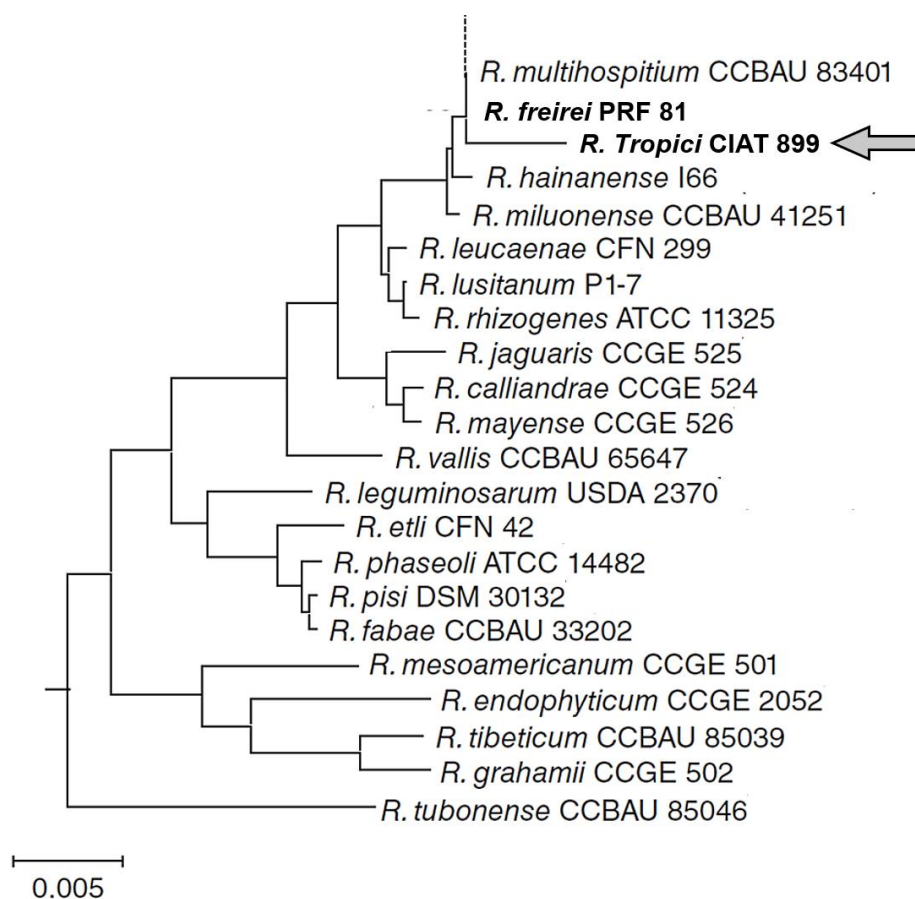


Figura 8. Árbol filogenético basado en la secuenciación del ARNr 16s de *R. tropici* CIAT 899 y otras especies de *Rhizobium*. Imagen tomada y modificada de Gomes *et al.*, 2015. La T de *tropici* es en minúscula.

El genoma de *Rhizobium tropici* CIAT 899

El genoma de CIAT 899 fue secuenciado y publicado en el año 2012 por Ormeño-Orrillo y colaboradores (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). Este genoma está compuesto por un cromosoma (~3,8 Mb) y tres plásmidos referenciados como: pRtrCIAT899a (~217 Kb), pRtrCIAT899b (~550 Kb) y pRtrCIAT899c (~2,1 Mb). El plásmido pRtrCIAT899b, corresponde al plásmido simbiótico y alberga todos los genes conocidos hasta la fecha implicados en simbiosis (como los genes *nod*, *nif* y *fix*). Como se ha mencionado anteriormente, este plásmido está altamente conservado en los rizobios que pertenecen a la simbiovariedad *tropici*. En la **Tabla 3**, se recopilan las características globales del genoma de CIAT 899 y se facilita el acceso a sus secuencias de la base de datos NCBI.

Una de las características que hacen realmente interesante a CIAT 899 a nivel genómico es la presencia de cinco copias del gen *nodD* (*nodD1*, *nodD2*, *nodD3*, *nodD4* y *nodD5*) y

tres copias del gen *nodA* (*nodA1*, *nodA2* y *nodA3*) en su genoma. Al igual que CIAT 899, otras especies pertenecientes a la simbiovariedad *tropici* también portan cinco copias del gen *nodD*, como las estirpes *R. leucaenae* CFN 299 y *R. freirei* PRF 81 (del Cerro *et al.*, 2015). Este hecho sugiere que la vía de regulación de los genes simbióticos en estos rizobios sea más compleja de los que se conoce hasta el momento.

Tabla 3. Componentes del genoma de *R. tropici* CIAT 899 y otros datos relevantes.

	Total de genes	Genes codificantes	Tamaño (pb)	G+C (%)	ARNr	ARNt	Acceso NCBI
Cromosoma	3,727	21	3,837,060	59.9	9	53	CP004015.1
pRtrCIAT899c	1,876	47	2,083,197	58.6			CP004018.1
pRtrCIAT899b (pSym)	523	68	549,467	57.6			CP004017.1
pRtrCIAT899a	209	12	216,610	59.4			CP004016.1
Total	6,335	148	6,686,334	59.5			

En el plásmido simbiótico de CIAT 899 se han identificado diez cajas de nodulación, enumeradas desde la NB1 a la NB10: aguas debajo de la NB1 se encuentra el operón conformado por los genes *nodA1BCSUIJHPQ*; la NB2 regula la expresión de los genes *nodA2hsnTnodFE*; el gen *nodM* es controlado por la NB3; los genes implicados en la síntesis de ácido indol acético (*y4wGFE*) se encuentran precedido por la NB4; la NB5 controla a los genes *rtciat899_pb01550* y *rtciat899_pb01545*; la NB6 se haya aguas arriba a *rtciat899_pb00370* y *rtciat899_pb00375*; las NB7, NB8 y NB10 regulan a los genes *rtciat899_pb00455*, *rtciat899_pb00495* y *rtciat899_pb00540* respectivamente, y finalmente los genes *nodD2* y *rtciat899_pb01075* se localizan bajo la NB9 (Pérez-Montaña *et al.*, 2016). También se pueden encontrar otros genes simbióticos que no están precedidos por cajas de nodulación: los genes *nodD1*, *nodD3*, *nodD4*, *nodD5* y *nodA3*,

así como los genes de fijación de nitrógeno que se encuentran agrupados en diferentes operones (*nifHDKENX*, *nifTBAfixXCBA* y *fixNOPQ*). En la **Figura 9** se muestra la organización de los genes simbióticos identificados en el pSym de CIAT 899 y en la **Tabla 4** se detalla la función que corresponde a cada uno de ellos.

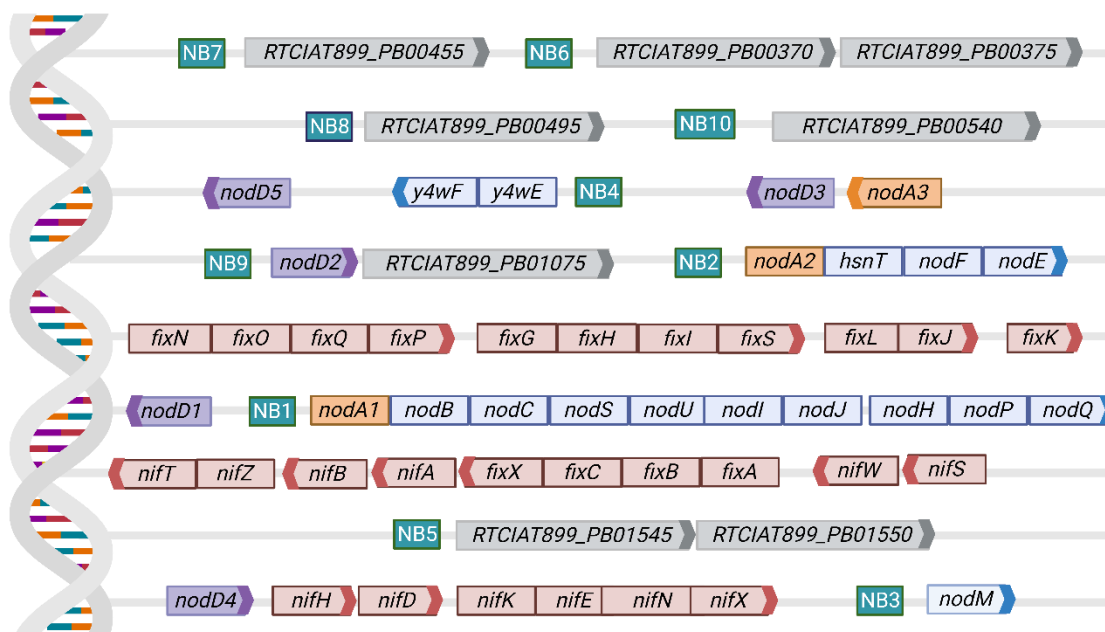


Figura 9. Genes simbióticos y NBs identificadas en el plásmido simbiótico de *R. tropici* CIAT 899.

Tabla 4. Genes simbióticos presentes en el pSym de *R. tropici* CIAT 899 y su función.

Gen	NB que lo antecede	Función
<i>nodA1</i>	NB1	Aciltransferasa
<i>nodB</i>	NB1	Quitina desacetilada
<i>nodC</i>	NB1	<i>N</i> -acetilglucosamina transferasa
<i>nodS</i>	NB1	<i>N</i> -metiltransferasa
<i>nodU</i>	NB1	<i>O</i> -carbomoiil transferasa
<i>nodIJ</i>	NB1	Transportador de NFs
<i>nodH</i>	NB1	Sulfotransferasa
<i>nodPQ</i>	NB1	Síntesis de sulfato en forma activa
<i>nodA2</i>	NB2	Aciltransferasa
<i>hsnT</i>	NB2	Función desconocida
<i>nodF,E</i>	NB2	Síntesis de ácidos grasos poliinsaturados

<i>nodM</i>	NB3	Glucosamina sintasa
<i>y4wG</i>	NB4	Síntesis de ácido indol acético (AIA)
<i>y4wF</i>	NB4	Síntesis de ácido indol acético (AIA)
<i>y4wE</i>	NB4	Síntesis de ácido indol acético (AIA)
<i>rtciat899_pb01550</i>	NB5	Función desconocida
<i>rtciat899_pb015545</i>	NB5	Función desconocida
<i>rtciat899_pb00370</i>	NB6	Función desconocida
<i>rtciat899_pb00375</i>	NB6	Función desconocida
<i>rtciat899_pb00455</i>	NB7	Función desconocida
<i>rtciat899_pb00495</i>	NB8	Función desconocida
<i>nodD2</i>	NB9	Regulador transcripcional de la familia LysR
<i>rtciat899_pb01075</i>	NB9	Regulador transcripcional de la familia AraC
<i>rtciat899_pb00540</i>	NB10	Función desconocida
<i>nodD5</i>		Regulador transcripcional de la familia LysR
<i>nodD3</i>		Regulador transcripcional de la familia LysR
<i>nodA3</i>		Aciltransferasa
<i>fixNOPQG</i>		Componente citocromo oxidasa
<i>fixI</i>		Transportador de tipo ATPasa
<i>fixS</i>		Proteína de fijación de nitrógeno
<i>fixL</i>		Sensor histidina quinasa
<i>fixJ</i>		Proteína reguladora
<i>fixK</i>		Regulador transcripcional
<i>nodD1</i>		Regulador transcripcional de la familia LysR
<i>fixA,B,C,X</i>		flavoproteína de transferencia de electrones
<i>fixX</i>		Ferredoxina
<i>nifA</i>		Regulador transcripcional de otros genes <i>nif</i>
<i>nifB</i>		Biosíntesis del cofactor Fe-Mo
<i>nifZ</i>		Proteína de fijación de nitrógeno
<i>nifT</i>		Proteína de fijación de nitrógeno NifT/FixT/FizU
<i>nifW</i>		Proteína de fijación de nitrógeno
<i>nifS</i>		Cisteína desulfurasa
<i>nifH</i>		Dinitrogenasa reductasa
<i>nifD</i>		α subunidad de la dinitrogenasa (proteína MoFe)

<i>nifK</i>	β subunidad de la dinitrogenasa (proteína MoFe)
<i>nifE,N,X</i>	Biosíntesis del cofactor Fe-Mo

Síntesis y secreción de NFs en presencia de estrés osmótico y flavonoides.

R. tropici CIAT 899 tiene la capacidad de producir un amplio rango de factores de nodulación bajo la influencia de diferentes tipos de estreses abióticos, siendo una característica que hace único a este rizobio. Los primeros estudios, se llevaron a cabo bajo condiciones de estrés por acidez. En ellos se demostraron que el perfil de NFs producidos por CIAT 899 a pH 4,7 y en presencia del flavonoide inductor apigenina es diferente al perfil de NFs liberados en presencia únicamente de apigenina a pH neutro. Concretamente se identificaron más de 50 NFs liberados a pH ácido, 29 a pH neutro y solo 15 de estas estructuras moleculares fueron común en ambas condiciones (Morón *et al.* en 2005). Es decir, la acidez del medio en presencia de un flavonoide inductor enriquece la producción de NFs. Siguiendo una aproximación similar se estudió la biosíntesis de NFs en CIAT 899 en presencia de un estrés osmótico por altas concentraciones de NaCl en el medio. Estévez y colaboradores (2009) demostraron por primera vez la capacidad de CIAT 899 de producir una mayor cantidad y variabilidad de NFs en presencia de estrés salino (NaCl 300 mM) y el flavonoide inductor apigenina, respecto a los NFs detectados únicamente en presencia del flavonoide apigenina. Años más tarde, fue Guasch-Vidal y colaboradores (2013) quienes demostraron por primera vez en los rizobios, que incluso en ausencia del flavonoide inductor apigenina, CIAT 899 es capaz de sintetizar NFs en presencia de estrés salino. Además, revelaron que la vía de activación de la síntesis de NFs bajo condiciones de estrés osmótico es independiente del regulador NodD1, pues la mutación en el gen *nodD1* resultó en la pérdida de la capacidad de producir NFs en presencia de apigenina, pero no suprimió la síntesis de estas moléculas en presencia de NaCl 300 mM (Guasch-Vidal *et al.*, 2013) (**Figura 10**).

Posteriormente, se demostró que es la proteína reguladora NodD2 la responsable de llevar a cabo la síntesis de NFs en presencia de estrés osmótico, puesto que la inactivación del regulador NodD2 suprime la capacidad de CIAT 899 de producir NFs en presencia de

estrés osmótico, pero no en presencia de apigenina. Asimismo, se observó que la pérdida de ambas proteínas, NodD1 y NodD2, es suficiente para abolir la síntesis de NFs en CIAT 899, en ambas condiciones de cultivo (**Figura 10**) (del Cerro *et al.*, 2017).

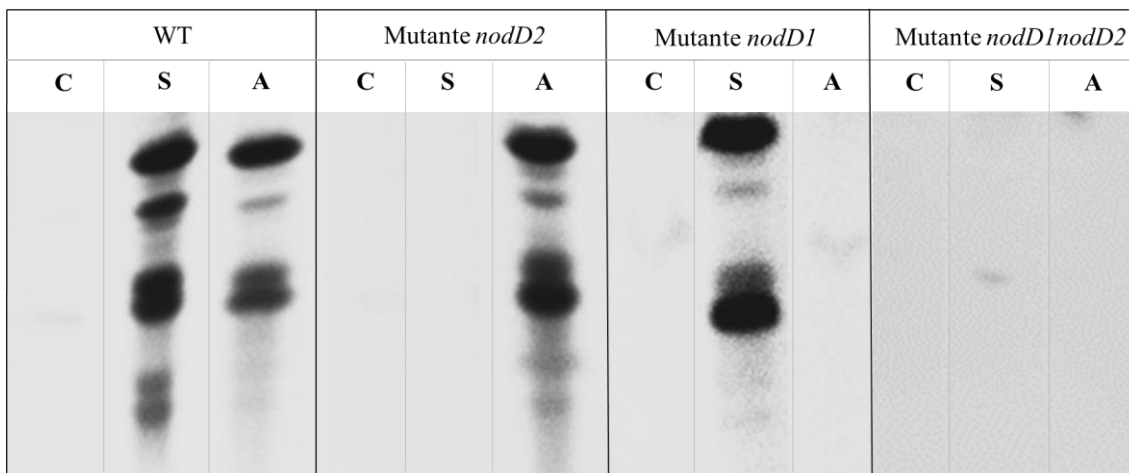


Figura 10. Cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *Thin Layer Chromatography*) del perfil de NFs liberados por la estirpe silvestre (WT) y los mutantes en los genes *nodD1* y *nodD2* en diferentes condiciones: C (sin molécula inductora), S (NaCl 300 mM) y A (Apigenina 3,7 μ M). Imagen tomada y modificada de del Cerro *et al* 2017.

Existen evidencias que señalan que el proceso simbiótico es altamente sensible al estrés osmótico y que, por ello, numerosos rizobios emplean mecanismos adaptativos para poder sobrevivir en estos ambientes, como por ejemplo la acumulación de osmolitos compatibles, cambios en los polisacáridos de superficie o potenciando la expresión de transportadores de membrana de tipo ABC. Sin embargo, la habilidad de activar la síntesis de NFs en condiciones de estrés osmótico únicamente se ha demostrado en CIAT 899 y, muy recientemente, en *S. fredii* HH103 (Guasch-Vidal *et al.*, 2013; Fuentes-Romero *et al.*, 2023).

Respecto a sus capacidades simbióticas, la estirpe CIAT 899 induce nódulos fijadores de nitrógeno en al menos *P. vulgaris*, *L. burtii* y *L. japonicus*. Los mutantes simples en los genes *nodD1* y *nodD2* mantienen la capacidad de nodular en con las plantas *P. vulgaris* y *L. burtii*, aunque la eficiencia del proceso sí se ve comprometida, disminuyendo significativamente el número de nódulos y el peso seco de las plantas. Sin embargo, el regulador NodD1 si es esencial para inducir la formación de nódulos en *L. japonicus*. Por otro lado, el doble mutante *nodD1nodD2* pierde la capacidad de nodular en las tres

leguminosas hospedadoras, lo que refuerza la importancia de estas proteínas en simbiosis (del Cerro *et al.*, 2015, 2017).

Estudios transcriptómicos en *Rhizobium tropici* CIAT 899

La secuenciación del genoma de CIAT 899 ha permitido realizar estudios transcriptómicos con el fin de entender los mecanismos reguladores que gobiernan la síntesis de NFs en esta bacteria.

Los primeros estudios de ARN-seq llevados a cabo en CIAT 899 en presencia de apigenina y bajo condiciones de estrés salino demostraron que el mismo grupo de genes localizados en el plásmido simbiótico se expresan de forma diferencial en ambas condiciones. Estos genes corresponden a los genes *nodA1BCSUIJH* [controlado por la NB1], *nodA2hsnTnodFE* [NB2], *nodM* [NB3], *y4wEF* [NB4], y a los genes *rtciat899_pb01550* y *rtciat899_pb01545* [NB5] (Pérez-Montaña *et al.*, 2016). Curiosamente, estos ensayos revelaron que el gen *nodD2* y el gen *rtciat899_pb01075*, que codifica para un regulador transcripcional de la familia AraC, se activan transcripcionalmente únicamente en presencia de NaCl 300 mM. De esta forma, se demostró por primera vez la activación transcripcional de los genes de nodulación en presencia de estrés salino.

Posteriormente, estudios de expresión de los genes simbióticos en los mutantes de los genes *nodD1* y *nodD2* confirmaron que la vía de activación de estos genes simbióticos se debe a la acción de las proteínas NodD1 y NodD2 en presencia de un flavonoide inductor y bajo condiciones de estrés osmótico, respectivamente. Además, las vías de biosíntesis de los NFs mediadas por estos reguladores parecen no ser totalmente independientes, ya que el regulador NodD1, de algún modo, parece ser necesario para una síntesis óptima de los NFs en condiciones de estrés osmótico. Esto se deduce tras observar que la activación transcripcional de los genes simbióticos en presencia de un estrés osmótico es significativamente menor en ausencia de NodD1 (del Cerro *et al.*, 2017).

EL HOSPEDADOR: Las leguminosas

Las plantas leguminosas utilizadas en esta Tesis Doctoral han sido *P. vulgaris* (judía), *L. japonicus* y *L. burttii*.

Phaseolus vulgaris

P. vulgaris, comúnmente conocida como frijol o judía, es una especie de planta leguminosa originaria del sur y América central. En la actualidad, esta planta se cultiva en todos los continentes debido a su gran valor nutricional, siendo una potente fuente de proteína vegetal, minerales, antioxidantes y compuestos bioactivos (Shamseldin *et al.*, 2020; Karavidas *et al.*, 2022). La leguminosa *P. vulgaris* puede crecer en diferentes condiciones edafo-climáticas y, dentro de esta especie, encontramos diversas biovariedades que se diferencian en el tiempo de crecimiento y producción de semillas, tamaño, forma y coloración (de Ron *et al.*, 2015). Es, además, considerada una planta promiscua por su capacidad de establecer simbiosis efectiva con un grupo genéticamente muy heterogéneo de rizobios (Laeremans & Vanderleyden, 1998; Martínez-Romero, 2003).

Lotus japonicus y *Lotus burttii*

L. japonicus se ha empleado como modelo experimental en el estudio de la simbiosis rizobio-leguminosa debido a su pequeño tamaño, su ciclo de vida corto (2-3 meses) y la disponibilidad de recursos genéticos y moleculares tras la secuenciación de su genoma, que es diploide ($n=6$) y relativamente pequeño (472 Mb) en comparación con el genoma de otras leguminosas (Sato *et al.*, 2008).

En cuanto a *L. burttii*, se trata de una especie muy cercana filogenéticamente a *L. japonicus*, lo que permite que se puedan cruzar. Además, florece y semilla en menos tiempo que *L. japonicus*, convirtiendo a esta planta en otra herramienta importante en investigación a pesar de que su genoma aún no se ha secuenciado (Kawaguchi *et al.*, 2005).

Vesículas extracelulares de membrana

Las vesículas extracelulares de membrana, abreviadas como MVs (del inglés, *Membrane Vesicles*), son pequeños compartimentos esféricos formados por una bicapa lipídica, que se originan a partir de evaginaciones de la membrana de las células (Beveridge, 1999).

La formación de estas vesículas parece ser un proceso común en todos los organismos eucariotas y procariotas, tanto en bacterias como en arqueas (Schwechheimer & Kuehn *et al.*, 2015). El ámbito de estudio de las MVs es muy extenso y diverso, ya que estas nanoesferas lipídicas, que pueden oscilar desde 20 a 400 nm de diámetro, contienen en su interior moléculas de diferente naturaleza bioquímica y están implicadas en numerosos fenómenos celulares (Sartorio *et al.*, 2021). De hecho, son cada vez más los procesos biológicos que se asocian a la liberación de vesículas de membrana.

Ruta de biogénesis y cargo de las MVs en bacterias Gram-negativas

En bacterias Gram-negativas, las MVs se pueden liberar al medio extracelular mediante eventos de evaginación de la envoltura celular o a partir de la lisis explosiva de la célula, e independientemente al mecanismo que las libera, las MVs pueden estar constituidas por una única membrana, si se han generado a partir de la membrana externa de la bacteria (OMV, del inglés *Outer Membrane Vesicle*) o pueden englobar ambas membranas, externa e interna (OIMV, del inglés *Outer-Inner Membrane Vesicle*) (**Figura 11**) (Toyofuku *et al.*, 2023).

En cuanto al cargo de estas vesículas, es decir a las moléculas que contienen en su interior o asociadas a ellas, se puede encontrar una gran variedad de proteínas (citosólicas, periplasmáticas o de membrana), lípidos (LPS, peptidoglicanos o fosfolípidos, entre otros), material genético (ADN o ARN) u otras sustancias como antibióticos, iones, metales, etc. (Lindmark *et al.*, 2009; Koeppen *et al.*, 2016; Vanaja *et al.*, 2016). Incluso, estudios recientes han reportado la presencia de fagos en el interior de estas partículas (Toyofuku *et al.*, 2023).

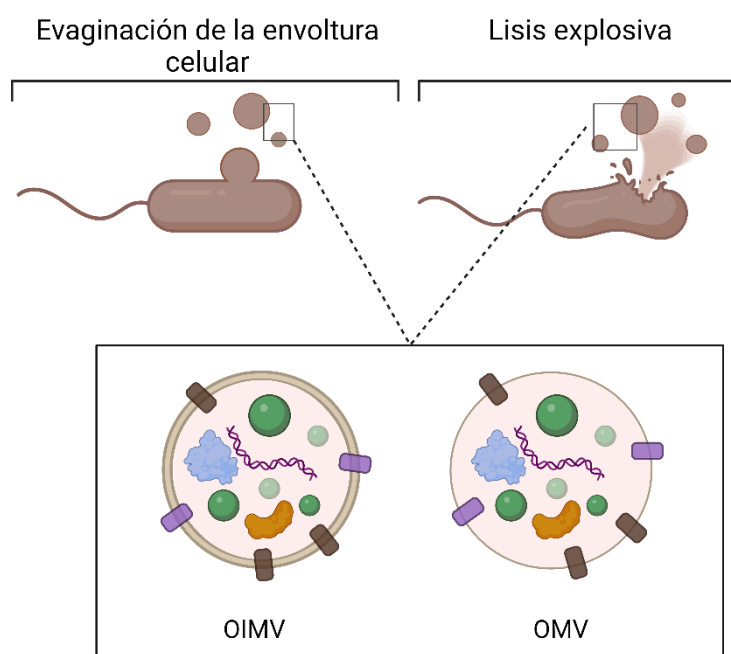


Figura 11. Tipos de MVs en base al mecanismo de liberación al medio extracelular y a su estructura: OIMV (*Outer-Inner Membrane Vesicles*) y OMV (*Outer Membrane Vesicles*).

Procesos biológicos en los que participa

Las MVs liberadas por bacterias participan en una amplia variedad de procesos biológicos, como en la transferencia horizontal de material genético, en la liberación de proteínas mal plegadas originadas ante diferentes tipos de estreses, en el establecimiento de biopelículas, en la adquisición de nutrientes y metales como por ejemplo el hierro, en la resistencia a antibióticos o en la modulación de la respuesta inmune del hospedador en el caso de organismos patógenos (Schwechheimer & Kuehn, 2015; Haurat *et al.*, 2015; Jan, 2017).

No es sorprendente que las MVs tomen parte en importantes eventos biológicos, ya que actúan como una potente herramienta en la adaptación de los diferentes organismos al medio (Schwechheimer & Kuehn, 2015). Especialmente, son importantes en la secreción de moléculas hidrofóbicas, por ejemplo, favorecen la solubilización de proteínas asociada a membrana, toxinas o factores de virulencia, que en su mayoría son poco solubles en agua. Además, las MVs actúan como barrera de protección de los elementos que contienen frente a la degradación de enzimas hidrolíticas u otras condiciones fisicoquímicas del medio extracelular, como el choque térmico (Toyofuku *et al.*, 2023).

Otra de las grandes ventajas que supone esta vía de secreción es la capacidad de mantener las moléculas concentradas con el fin de garantizar su actividad a largas distancias. Es decir, si se compara el modo de secreción de una molécula a través de MVs versus difusión pasiva o mediante transportadores, las moléculas secretadas mediante transportadores difunden en el medio de modo que a cierta distancia no alcanzan la concentración suficientemente para mantener su actividad biológica. Sin embargo, las moléculas liberadas en MVs se mantendrán concentradas en el interior de estos compartimentos y, aunque estas vesículas difundan en el medio, una sola de ellas puede contener la concentración suficiente para desencadenar una respuesta en su célula diana, garantizando así la actividad biológica de las moléculas a largo alcance (**Figura 12**). Este fenómeno se ha descrito recientemente en *Paracoccus* sp., que libera moléculas hidrofóbicas de percepción de *quorum* vía MVs, y se ha denominado como “*quantal secretion*” (Toyofuku *et al.*, 2023).

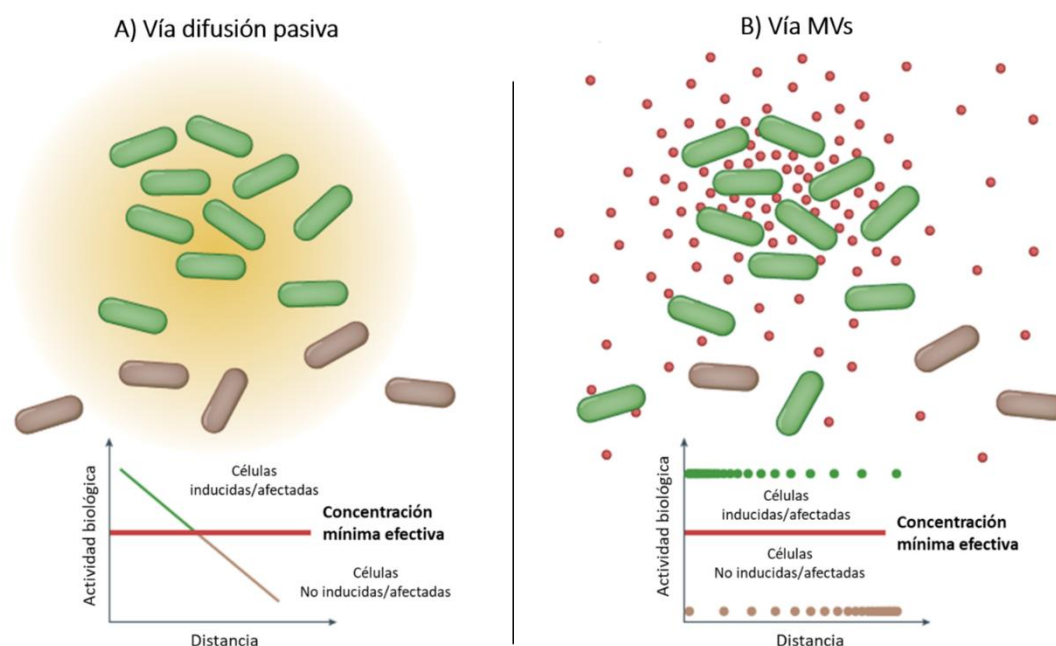


Figura 12. Modelo comparativo de la liberación de una molécula señal al medio extracelular mediante difusión pasiva (**A**) y a través de vesículas de membrana (**B**). Imagen tomada y modificada de Toyofuku *et al.*, 2023.

Las MVs también se han descrito como un mecanismo de comunicación en bacterias. Esta comunicación puede ser intraespecífica, interespecífica o incluso, entre organismos de diferentes reinos, pudiendo ser una célula vegetal o animal diana de las vesículas

liberadas por una bacteria. De hecho, muchos autores incluyen a las vesículas dentro de los sistemas de secreción de las células, atribuyéndoles el nombre de sistema de secreción de tipo 0 (T0SS), ya que funcionan como transportadores de biomoléculas desde el interior celular al medio extracelular, interfiriendo con las funciones fisiológicas de su célula diana (Guerrero-Mandujano *et al.*, 2017)

El mecanismo por el cual se selecciona el cargo de las MVs es un gran enigma. Del mismo modo, se desconocen las bases que regulan la especificidad de las MVs y sus células dianas (Schwechheimer & Kuehn *et al.*, 2015). Diferentes hipótesis sugieren que puede deberse a cambios en los potenciales de las membranas o por el reconocimiento de ciertos ligandos por receptores específicos de las células dianas (Tashiro *et al.*, 2017; Renelli *et al.*, 2004; Toyofuku *et al.*, 2017, 2023).

MVs y plantas

En los últimos años, los estudios destinados a las MVs liberadas por bacterias Gram-negativas y su interacción con las plantas han generado un fuerte impacto. En su mayoría, estos trabajos se centran en estudiar papel de las MVs liberadas por organismos patógenos mediando la respuesta inmune de las plantas (Sidhu *et al.*, 2008; Bonnington & Kuehn, 2014; Solé *et al.*, 2015; Katsir & Bahar, 2017; Feitosa-Junior *et al.*, 2019). Así, se ha demostrado que las vesículas liberadas por *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 contienen potentes elicitores inmunogénicos, como el antígeno O que conforma el LPS, con la función de evadir la respuesta de defensa de la planta mientras el patógeno transmite factores de virulencia en la célula hospedadora (Chowdhury & Jagannadham, 2013; Solé *et al.*, 2015). En cambio, otros estudios manifiestan que las MVs de ciertos organismos patógenos actúan como activadores de los sistemas de defensa de la planta, como es el caso de las MVs de *X. campestris* pv. *Campestris* ATCC 33913 y *X. oryzae* pv. *oryzae* PXO99, que portan el factor de elongación EF-Tu que es percibido por receptores del sistema inmune de *Arabidopsis thaliana* (Katsir & Bahar, 2017).

En la actualidad, la gran parte de los estudios están destinado a la interacción planta-patógeno y muy pocos están involucrados en el estudio de las vesículas liberadas por microorganismos simbiotes, como es el caso de los rizobios (Sartorio *et al.*, 2021). Así, el estudio de las vesículas de membrana liberadas por rizobios y su implicación en

simbiosis es muy reciente y limitado. Fue Taboada y sus colaboradores (2019) quienes identificaron por primera vez la presencia de NFs en las vesículas aisladas de los cultivos de *Rhizobium etli* inducidos con el flavonoide naringenina, activador de la síntesis de NFs en esta bacteria. Además, demostraron que estas moléculas mantenían su actividad biológica tras añadir los aislados vesiculares a su leguminosa hospedadora *P. vulgaris* y observar la curvatura de los pelos radicales. De esta forma se lanzó la hipótesis de que las MVs liberadas por los rizobios podrían tener un efecto importante en las fases más tempranas del proceso simbiótico (Taboada *et al.*, 2019).

Estudios posteriores llevados a cabo en *S. fredii* HH103 también han demostrado que las vesículas aisladas en presencia del flavonoide genisteína, activador de la síntesis de NFs en este rizobio, presentan actividad biológica al inducir tanto la curvatura de los pelos radicales como la activación de los genes simbiótico de la soja, planta hospedadora. Además, en este trabajo es la primera vez que se integran análisis de los perfiles lipídicos y proteómicos de las MVs liberadas por *S. fredii* HH103 en presencia de genisteína (Li *et al.*, 2022).

OBJETIVOS

La relación simbiótica que se establecen entre los rizobios y las plantas leguminosas es crucial para favorecer el rendimiento de los cultivos al mismo tiempo que se garantiza la sostenibilidad del medio ambiente. Por ello, contribuir al conocimiento de los diferentes mecanismos genéticos, moleculares y fisiológicos que se establecen en esta interacción mutualista es de suma importancia para la optimización de este proceso biológico.

Con esta finalidad, en la presente Tesis Doctoral se plantean los siguientes objetivos:

1. Caracterización del gen *onfD* de *R. tropici* CIAT 899.
2. Estudio de los cinco reguladores NodD de *R. tropici* CIAT 899.
3. Aislamiento y estudio de las MVs liberadas por CIAT 899 en vida libre en presencia y ausencia del flavonoide apigenina.
4. Purificación y análisis de MVs presentes en el espacio peribacteroideo de los nódulos desarrollados en la simbiosis *R. tropici* CIAT 899 – *P. vulgaris*.

CAPÍTULO 1.

OnfD, an AraC-type transcriptional regulator encoded by *Rhizobium tropici* CIAT 899 and involved in Nod factor synthesis and symbiosis.



OnfD, an AraC-Type Transcriptional Regulator Encoded by *Rhizobium tropici* CIAT 899 and Involved in Nod Factor Synthesis and Symbiosis

Pablo del Cerro,^{a*} Paula Ayala-García,^a Pablo Buzón,^a Roger Castells-Graells,^b Francisco Javier López-Baena,^a Francisco Javier Ollero,^a Francisco Pérez-Montaño^a

^aDepartamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

^bDepartment of Biological Chemistry, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom

Pablo del Cerro and Paula Ayala-García contributed equally to this article. Author order was determined by drawing straws.

ABSTRACT *Rhizobium tropici* CIAT 899 is a broad-host-range rhizobial strain that establishes symbiotic interactions with legumes and tolerates different environmental stresses such as heat, acidity, or salinity. This rhizobial strain produces a wide variety of symbiotically active nodulation factors (NF) induced not only by the presence of plant-released flavonoids but also under osmotic stress conditions through the LysR-type transcriptional regulators NodD1 (flavonoids) and NodD2 (osmotic stress). However, the activation of NodD2 under high-osmotic-stress conditions remains elusive. Here, we have studied the role of a new AraC-type regulator (named as OnfD) in the symbiotic interaction of *R. tropici* CIAT 899 with *Phaseolus vulgaris* and *Lotus* plants. We determined that OnfD is required under salt stress conditions for the transcriptional activation of the nodulation genes and therefore the synthesis and export of NF, which are required for a successful symbiosis with *P. vulgaris*. Moreover, using bacterial two-hybrid analysis, we demonstrated that the OnfD and NodD2 proteins form homodimers and OnfD/NodD2 form heterodimers, which could be involved in the production of NF in the presence of osmotic stress conditions since both regulators are required for NF synthesis in the presence of salt. A structural model of OnfD is presented and discussed.

IMPORTANCE The synthesis and export of rhizobial NF are mediated by a conserved group of LysR-type regulators, the NodD proteins. Here, we have demonstrated that a non-LysR-type regulator, an AraC-type protein, is required for the transcriptional activation of symbiotic genes and for the synthesis of symbiotically active NF under salt stress conditions.

KEYWORDS AraC-type regulators, *Rhizobium tropici*, legumes, plant-microbe interactions, regulation of gene expression, symbiosis, transcriptional regulation

Rhizobia are soil proteobacteria that establish symbiosis with legumes. As an outcome of this mutualistic interaction, plants develop nodules, root organs where bacteria differentiate into bacteroids. This differentiated endosymbiotic form reduces atmospheric nitrogen to ammonia, increasing the availability of this constraining nutrient for the plant (1). The rhizobium-legume symbiosis requires a complex and evolved molecular exchange of signals between both partners of the symbiosis. This molecular dialogue is initiated by the legume roots' exudation of flavonoids, phenylpropanoid metabolites that are recognized by bacterial NodD proteins. These proteins bind to conserved promoter regions located upstream of nodulation (*nod*) genes, the *nod* boxes (NB), activating their expression (2–4). The *nod* genes are involved in the synthesis and export of specific lipochitooligosaccharides or Nod factors (NF) that, in

Citation del Cerro P, Ayala-García P, Buzón P, Castells-Graells R, López-Baena FJ, Ollero FJ, Pérez-Montaño F. 2020. OnfD, an AraC-type transcriptional regulator encoded by *Rhizobium tropici* CIAT 899 and involved in Nod factor synthesis and symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 86:e01297-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01297-20>.

Editor Eric V. Stabb, University of Illinois at Chicago

Copyright © 2020 del Cerro et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Pablo del Cerro, Pablo.Del-Cerro-Sanchez@jic.ac.uk, or Francisco Pérez-Montaño, fperez@us.es.

* Present address: Pablo del Cerro, Department of Cell and Developmental Biology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, United Kingdom.

Received 30 May 2020

Accepted 16 July 2020

Accepted manuscript posted online 24 July 2020

Published 17 September 2020

turn, trigger different plant processes essential for nodulation success, such as root hair deformation, the development of the infection thread, and the formation of root nodule primordia (5–7). In addition to NF, other molecules and/or processes are also important for a successful legume-rhizobium symbiosis, such as surface polysaccharides, phytohormone production, motility, quorum sensing, and protein secretion systems (8–14).

Rhizobium tropici CIAT 899 is a broad-host-range rhizobial strain isolated from tropical acidic soils of South America that is tolerant to diverse environmental stresses, such as heat, acidity, or salinity, and induces the formation of nitrogen-fixing nodules on several legumes, including *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, and *Lotus burttii* (15–17). The availability of a CIAT 899 genome and transcriptome public database, the strain's tolerance to multiple abiotic stresses, and the use this rhizobium as an inoculant for plant crops have made CIAT 899 a model strain in the rhizobium-legume symbiosis field (12, 18–22). The CIAT 899 genome has multiple copies of *nodD* ($n = 5$) and *nodA* ($n = 3$) genes in the symbiotic plasmid (20). Previous reports assessed the role of the five NodD and the three CIAT 899 NodA proteins in the symbiotic performance with the above-mentioned legume hosts and found that *nodD1* or both *nodA1* and *nodA3* genes are required for the formation of nitrogen-fixing nodules in *L. japonicus* but not in *L. burttii* and *P. vulgaris*. In the common bean, the mutation of both *nodD1* and *nodD2* or of the three *nodA* genes simultaneously blocks the nodulation process (21, 23). Nevertheless, the absence of NodD2 or simultaneously of NodA1 and NodA3 has detrimental effects on the symbiotic performance with *P. vulgaris*.

The presence of inducing flavonoids (apigenin) and also osmotic stress conditions (salt or mannitol) induces the production of a wide variety of symbiotically active NF in CIAT 899. The synthesis of these NF is regulated by NodD1 (apigenin) and NodD2 (osmotic stress) (15, 16, 21, 22). Our previous transcriptomic study showed that most of the CIAT 899 symbiosis-related genes (*nodA1BCSUIJH* [controlled by *nod* box 1, NB1], *nodA2 hsnT nodFE* [NB2], *nodM* [NB3], *y4wEF* [NB4], and two genes with unknown functions, *rtciat899_pb01550* and *rtciat899_pb01545* [NB5]) are upregulated in the presence of both inducing molecules (12). However, a set of genes located downstream of NB9, *nodD2* and *RTCIAT899_PB01075* (coding for an AraC-type transcriptional regulator), are only activated under salt stress (12). Intriguingly, even though NodD1 is not directly involved in the activation of most symbiotic genes under osmotic stress conditions, the upregulation of these two genes depends on the presence of this protein (21). This finding suggests that NodD1 could be enhancing *nodD2* expression, but it is still unknown how salt induces the activation of the NodD2 protein.

The first described *araC* gene, in *Escherichia coli*, codes for a transcriptional regulator that controls the transcription of genes required for the uptake and catabolism of the sugar L-arabinose, the *araBAD* operon. AraC is sensitive to the level of arabinose, playing a dual role in controlling the expression of the *araBAD* and *araC* genes via the P_{araBAD} and P_{araC} promoters, respectively. The AraC protein is an activator of these genes in the presence of arabinose but acts as a repressor in the absence of this sugar (24). Regulation of both promoters by the AraC protein has been extensively characterized (25). In the absence of arabinose, one monomer of the AraC dimer occupies the *araI1* (arabinose inducer site I) site, while the other occupies a site ~200 bp upstream, known as *araO2* (arabinose operator site I) (26–28), leading to the formation of a DNA loop that blocks RNA polymerase from binding to the operon promoter (29, 30). However, when arabinose binds to the dimeric AraC, the AraC protein undergoes a conformational change and occupies the adjacent inducer sites *araI1* and *araI2*, resulting in the induction of the P_{araBAD} and P_{araC} promoters (31, 32). Therefore, arabinose destabilizes the AraC protein's binding to the *araI1-araO2* looped complex but stabilizes the protein by binding to the *araI1-araI2* sites. Thousands of AraC-type members have been identified, and some of them have been characterized in the *Bacteria* domain. These proteins are involved in the transcriptional regulation of a variety of important cellular processes, including carbon metabolism, activation of protein secretion systems, virulence, and abiotic stress responses (33–37). In comparison, description and

functioning of AraC-like regulator proteins have been poorly investigated in rhizobia. In *Sinorhizobium meliloti* 2011, an AraC-like transcription factor (CuxR) stimulates exopolysaccharide biosynthesis at elevated c-di-GMP levels (38), and it is also required for the induction of genes needed for α -galactoside utilization (39). In *S. meliloti* 2011, genes involved in the biosynthesis and transport of a siderophore produced under iron-starving conditions, the *rhbABCDEF* operon, are positively regulated by the product of the *rhrA* gene, an AraC-type transcriptional activator (40). In *Bradyrhizobium* sp. strain HW13, the AraC-type transcriptional regulator CadR controls the expression of the *cadABKC* cluster, which is involved in the conversion of several phenoxyacetic acids to their corresponding phenol derivatives (41). To our knowledge, there is only one report of an AraC-type protein involved in symbiosis in *S. fredii* NGR234. This bacterium improves its ability to symbiose with *P. vulgaris* through the heterologous expression of *orf816* (coding for an AraC/XylS-type transcriptional regulator) from *Rhizobium* sp. strain BR816 (42).

We have studied here the role in symbiosis of an undescribed AraC-type transcriptional regulator encoded by the *R. tropici* CIAT 899 RTCIAT899_PB01075 gene. We determined that this AraC-type regulator is necessary for a successful symbiosis with *P. vulgaris* and is involved in the transcriptional activation of the *nod* genes and NF synthesis under salt stress conditions. Bacterial two-hybrid analysis demonstrated that the AraC-type and NodD2 proteins can not only homodimerize but also form an AraC-type/NodD2 heterodimer, which could be responsible for the production of symbiotic molecules in the presence of osmotic stress conditions. In accordance with these findings, we renamed this AraC-type transcriptional regulator as OnfD (osmotic Nod factor regulator).

RESULTS

The OnfD amino acid sequence is conserved in *Rhizobium tropici* CIAT 899-related rhizobial strains but not in the other studied AraC-type regulators. OnfD (349 amino acids [aa], [AGB73490.1](#)), the deduced protein sequence of the CIAT 899 *onfD* gene with a predicted molecular mass of 42 kDa, is widespread in rhizobia and is highly conserved among CIAT 899-related strains. Its sequence is identical to the AraC-type regulators of *R. freirei* PRF 81 ([ENN88367.1](#)) and *Rhizobium* sp. strains CCGE531 ([AYG70418.1](#)), CCGE532 ([AYG76959.1](#)), and SEMIA 4088 ([WP_004112928.1](#)). It shows 94% identity to the *Rhizobium* sp. strain NXC24 protein ([AVA24063.1](#)), 81% identity to that of *R. jaguaris* CCGE525 ([AYG64285.1](#)), and <70% identity to an AraC-type regulator from *R. grahamii* CCGM3 ([RDJ02018.1](#)). As a first approach to understanding the putative function of OnfD, we performed a maximum-likelihood phylogeny analysis where we also included the AraC-type proteins characterized in previous studies (Fig. 1A). As expected, the AraC-type proteins of the strains phylogenetically related to CIAT 899 were grouped with OnfD. Interestingly, AraC/XylS (ORF816) from *Rhizobium* sp. strain BR816, which is involved in nodule formation, was also included in this group, suggesting that OnfD might be involved also in symbiosis. On the bottom branch of the tree, there were other AraC-like regulators (RhrA, CuxR, CadR, and AraC) that were not related phylogenetically either with OnfD or among themselves.

The *nodD2* and *onfD* genes are not cotranscribed but are simultaneously activated in the presence of osmotic stress conditions. The NB9 promoter in the CIAT 899 genome is located 979 and 2,123 bp upstream of the *nodD2* (RTCIAT899_PB01070) and *onfD* (RTCIAT899_PB01075) start codons, respectively. To determine the regulation of these two genes in the presence of flavonoids (3.7 μ M apigenin) and osmotic stress (300 mM salt and 400 mM mannitol), RNA sequencing (RNA-seq) data deposited in public repositories ([PRJNA470887](#), [PRJNA326592](#), and [PRJNA305690](#)) were reanalyzed to obtain the fold change values for the *nodD2* and *onfD* genes with respect to noninduced cultures (Table 1). In the wild-type CIAT 899 strain, the transcriptional activation of *nodD2* and *onfD* was detected in cultures supplemented with salt (*nodD2* = 3.01 and *onfD* = 3.87) or mannitol (*nodD2* = 2.26 and *onfD* = 3.61) but not with apigenin (*nodD2* = -1.25 and *onfD* = 1.15) and also not in a *nodD1* mutant

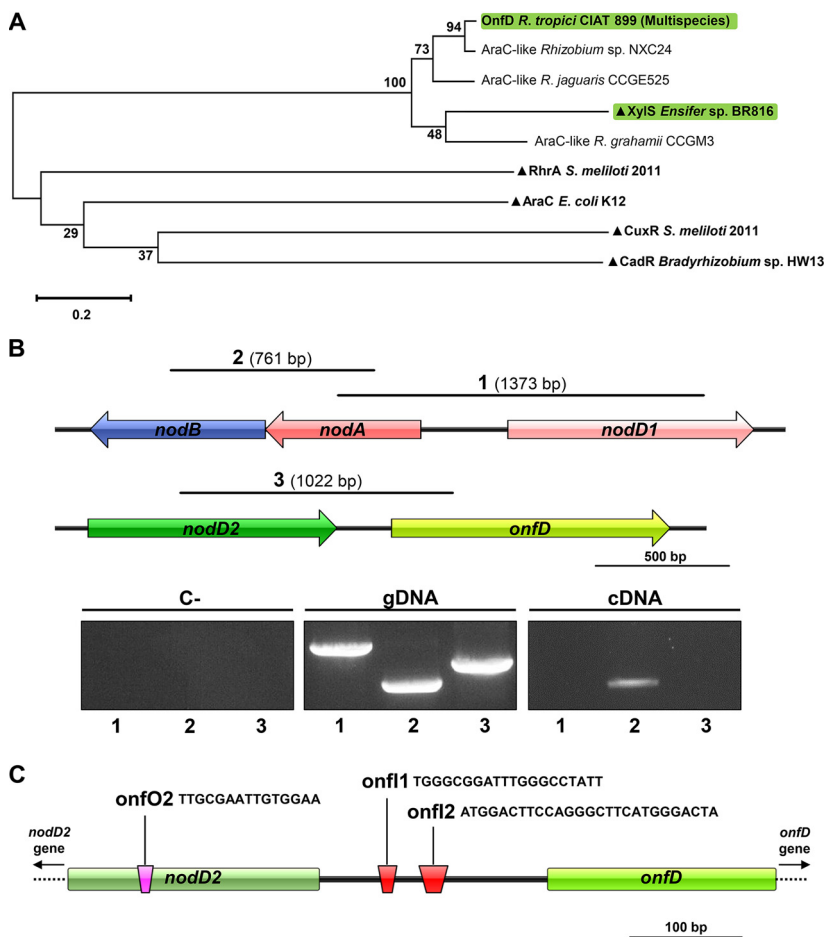


FIG 1 (A) Molecular phylogenetic tree analysis generated by using the maximum-likelihood method. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. The tree is drawn to scale, where the branch lengths are measured in the number of substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated. AraC-type regulators (green) are involved in nodulation. ▲, AraC-type regulators with known functions. (B) Cotranscription assays of *Rhizobium tropici* CIAT 899 *nodD2* and *onfD* genes, including the genetic organization of the *nodD1-nodA1-nodB* and *nodD2-onfD* regions. Solid lines show the positions of the *nodD1-nodA1* (segment 1), *nodA1-nodB* (segment 2), and *nodD2-onfD* (segment 3) fragments that were assayed in PCR (gDNA) and RT-PCR (cDNA) experiments. Agarose gel electrophoresis shows the results from PCR and RT-PCR experiments. Amplicon 1 size, 1,373 bp; amplicon 2 size, 761 bp; amplicon 3 size, 1,022 bp. (C) Identification of the putative inducer (in red) and operator (in pink) sites of the *onfD* promoter region. Tandem repeat sequences are displayed.

background (Table 1). Nevertheless, in a *nodD2* mutant background, *onfD* expression in the presence of both osmotic stress conditions remained activated (salt = 2.55 and mannitol = 3.55), suggesting that NodD2 was not required for the *onfD* upregulation. To further investigate whether the two genes were cotranscribed, we used reverse transcription-PCR (RT-PCR) to detect putative CIAT 899 mRNAs covering the 3' start site

TABLE 1 Fold change values of the *R. tropici* CIAT 899 genes located downstream of the *nod* box 9 in different genetic backgrounds

Locus tag/gene	Fold change ^a												
	CIAT 899 (12, 20, 21)			<i>nodD1</i> mutant (12, 20)			<i>nodD2</i> mutant (12, 20, 21)				<i>onfD</i> mutant (this study)		
	A	S	M	NIC	A	S	NIC	A	S	M	NIC	A	S
RTCIAT899_PB01570/ <i>nodD2</i>	-1.25	3.01	2.26	-1.88	1.45	1.03	-	-	-	-	-1.10	1.10	-1.28
RTCIAT899_PB01575/ <i>onfD</i>	1.15	3.87	3.61	-1.22	-1.29	1.44	1.27	1.49	2.55	3.51	-	-	-

^aSignificant transcriptional changes (≥ 3 -fold induction respect to CIAT 899 noninduced cultures) in the presence of apigenin (3.7 μ M) (A), salt (300 mM) (S), and mannitol (400 mM) (M) are highlighted in dark gray. NIC, noninduced culture. Slight transcriptional changes (≥ 2 -fold induction/ < 3 -fold induction) are highlighted in light gray. Source references are indicated in parentheses. -, gene is mutated on this genetic background.

of *nodD2* and the 5' end of *onfD* (Fig. 1B) that had been obtained in the absence of inducing molecules. As a positive control, we used primer pairs that allow the amplification of fragments of both *nodA1* and *nodB* genes. As a negative control, primer pairs of both *nodD1* and *nodA* genes (divergent orientation) were used. All of these primer pairs allowed the amplification of fragments of the expected size when CIAT 899 gDNA was used as the template. However, when cDNA from a noninduced culture of CIAT 899 was used, only the *nodA1-nodB* fragment (761 bp) was amplified (Fig. 1B). These results confirm that the *R. tropici* CIAT 899 *nodD2* and *onfD* genes do not belong to the same transcriptional unit.

The intergenic *nodD2-onfD* region (205 bp) was also investigated for the identification of direct (tandem) repeats, since a consensus sequence formed by tandem repeats is present in all AraC-type promoters, allowing protein binding (*ara1* and *ara2* inducer sites) (25). Two tandem repeats were identified in the promoter region of *onfD* (Fig. 1C), which could correspond to *onf1* and *onf2* inducer sites. As previously mentioned, the AraC regulator in *E. coli* acts as an activator or repressor depending on the presence of the ligand (24). Thus, in the absence of the inducing molecule, one monomer of the AraC occupies *ara1* while the other monomer occupies the operator site *araO2* (also a tandem repeat) ~200 bp upstream (26–30). Interestingly, in CIAT 899, a tandem repeat was also identified 202 bp upstream of the putative *onf1* site, within the *nodD2* gene, which could correspond to the *onfO2* site (Fig. 1C). This suggests that OnfD may be involved in the transcriptional regulation of the *onfD* and *nodD2* genes.

OnfD activates *nod* gene expression and NF production under salt stress conditions. In a previous report from our research group, we determined that the CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of NF under salt stress (21). However, the underlying molecular mechanism remains uncertain. Since both *nodD2* and *onfD*, located downstream of NB9, are activated under osmotic stress, we studied the putative implication of OnfD in *nod* gene upregulation and NF synthesis under these conditions. Thus, plasmid pMP240, harboring the conserved *nodA* promoter of *R. leguminosarum* bv. *viciae* fused to the *lacZ* reporter gene, was first transferred by conjugation to the CIAT 899 wild-type strain, as well as to the *onfD* deletion mutant (Δ *onfD*) and its complemented strain. β -Galactosidase assays showed similar activation levels in the presence of apigenin (3.7 μ M), salt (300 mM), and mannitol (400 mM) in all the strains, with the exception of the *onfD* mutant, in which the activation of the promoter was detected in cultures supplemented with apigenin but not in the presence of salt or mannitol (Fig. 2A). This assay pointed out that OnfD is involved in the transcriptional activation of *nod* genes under osmotic stress conditions. To confirm the previous results, plasmids harboring the promoter regions containing the NB of the CIAT 899 *nodA1* and *nodA2* genes fused to *lacZ* were obtained and conjugated to the CIAT 899 wild-type strain and the *onfD* mutant. Then, β -galactosidase assays were performed in the presence or in the absence of apigenin, mannitol, and salt (Fig. 2B). As previously happened, *nodA1* and *nodA2* promoter activations were detected in both assayed strains in the presence of apigenin, whereas promoter activation under osmotic stress conditions was only detected in the wild-type strain (Fig. 2B). Considering the correlation between β -galactosidase assays and NF production (19–21) and in order to make more feasible the experimental approach, we only used 300 mM salt to induce osmotic stress. Thus, the correlation between upregulation of the *nodA1* and *nodA2* expression and synthesis of NF in the Δ *onfD* mutant was demonstrated by reversed-phase thin-layer chromatography (RP-TLC) (Fig. 2C). The NF profiles of the wild-type and the Δ *onfD* mutant strains were obtained radioactively labeling NF with 14 C. The TLC assay showed that in the absence of OnfD, NF production was abolished in the presence of high concentrations of salt but not in the presence of apigenin. For an in-depth analysis, the chemical identification of the NF produced by the Δ *onfD* mutant was also obtained by UHPLC-MS/MS in the presence of apigenin (3.7 μ M) or NaCl (300 mM) (see Table S1 in the supplemental material). In a previous study, 36 and 29 NF were detected in CIAT 899 supernatants in the presence of salt and apigenin, respectively (43). Here, as a positive control of NF production, the supernatant of the CIAT 899

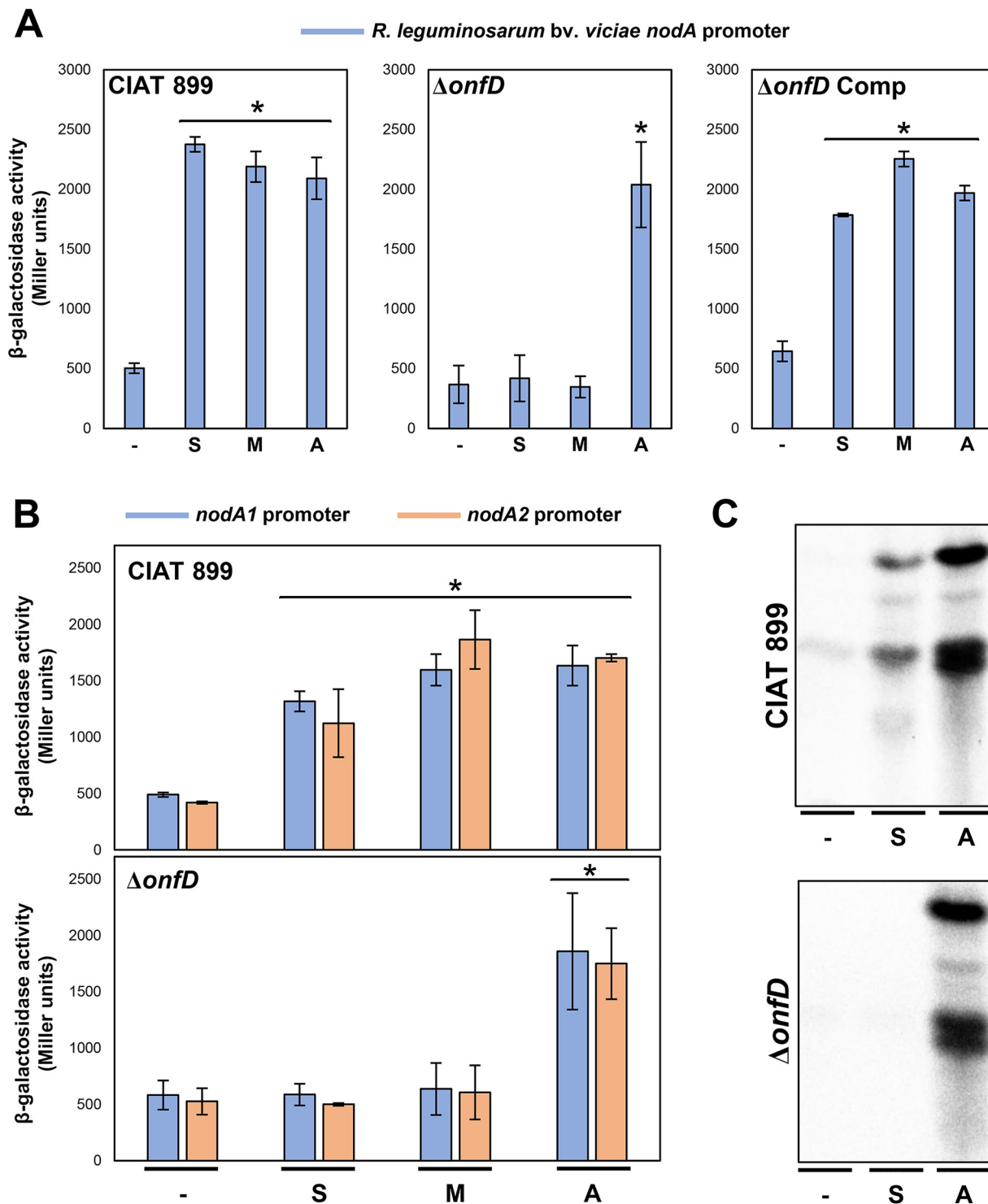


FIG 2 (A and B) β-Galactosidase activities of the CIAT 899 $\Delta onfD$ strain carrying plasmid pMP240 (*R. leguminosarum* bv. *viciae* *nodA* promoter) and pMP220, which contains the CIAT 899 *nodA1* and *nodA2* promoters fused to the *lacZ* gene. Assayed conditions included YM medium (-), YM supplemented with 300 mM NaCl (S), YM supplemented with 400 mM mannitol (M) and YM supplemented with 3.7 μ M apigenin (A). Parameters were individually compared to that obtained in YM medium (-) by using a Mann-Whitney nonparametric test. Values tagged by asterisks (*) are significantly different at the level $\alpha = 5\%$. Error bars represent the standard deviations of data. (C) TLC analysis of Nod factors produced by CIAT 899 and $\Delta onfD$ mutant grown in YM medium (-), YM supplemented with 300 mM NaCl (S), and YM supplemented with 3.7 μ M apigenin (A).

wild-type strain grown in the presence of both apigenin and salt was employed (25 different NF). The mass spectrometry analyses showed that the $\Delta onfD$ strain synthesizes 29 NF in the presence of apigenin but only 4 NF under salt stress conditions. These results indicated that OnfD is involved in the production of NF in CIAT 899 under salt stress conditions.

In our previous transcriptomic studies of CIAT 899, at least 17 genes located in the symbiotic plasmid and controlled by 5 different NB were overexpressed in the presence of both inducer molecules, apigenin and salt (12). To determine whether transcriptional activation of all the symbiosis-related genes under salt stress conditions is mediated by OnfD, 6 RNA-seq libraries (PRJNA605332) were generated from the *onfD* mutant grown in the presence or absence of apigenin (3.7 μ M) and salt (NaCl 300 mM) (two independent biological experiments for each condition). These RNA-seq libraries were compared with an RNA-seq library from the wild-type strain grown in the absence of inducing molecules (PRJNA305690) (see Data Set S1 in the supplemental material). Quality control of each run, sample normalizations and statistical procedures were performed as previously described (12). The data set was validated by quantitative RT-PCR (qRT-PCR), obtaining in all cases positive correlation degrees in fold change values of 7 selected genes between the qRT-PCR and the RNA-seq data (see Data Set S2). Focusing our attention on these 17 symbiosis-related genes upregulated in the presence of both inducing molecules, RNA-seq experiments indicated that their transcriptional activation was detected in cultures of the $\Delta onfD$ mutant supplemented with apigenin but not with salt, confirming the role of OnfD in the transcriptional activation of these symbiotic genes under salt stress (Table 2). The fold change values of the *nod* genes in the *onfD* mutant in the presence of apigenin (induction) and salt (noninduction) were similar to those previously observed for the *nodD2* mutant strain under the same conditions (Fig. 3A). Interestingly, transcriptomic data from CIAT 899 grown in the presence of salt showed that the *nodD2* salt-mediated upregulation did not occur in the *onfD* mutant background, indicating that OnfD is involved in the regulation of *nodD2* expression under salt stress condition (Tables 1 and 2).

The RNA-seq data also showed that other genes, related to nonsymbiotic biological processes, were differentially regulated in the *onfD* mutant. Therefore, a functional enrichment from the RNA-seq data in the *onfD* mutant was carried out to assign the statistically overrepresented biological processes (activated or repressed) using data available at the UniProt database (Gene Ontology [GO]). All the biological processes differentially regulated in the *onfD* mutant are shown in Data Set S3 in the supplemental material. Remarkably, in the absence of *nod* gene-inducing molecules, some of the differentially downregulated genes were involved in bacterial-type flagellum-dependent cell motility, chemotaxis and polysaccharide transport (Fig. 3B). All of these biological processes were also differentially activated/repressed in the presence of apigenin, indicating that OnfD may be involved in the regulation of several other biological processes. The presence of apigenin exclusively activated a set of biological processes such as hydrogen sulfide biosynthesis, phenylacetate catabolism, and, as expected, nodulation, whereas some biological processes were shared also with salt conditions, such as ATP hydrolysis, coupled proton transport, and polysaccharide synthesis and transport (this last one was downregulated in all tested conditions). Finally, the presence of salt specifically induced other biological processes such as ATP synthesis coupled to electron transport, inositol phosphate dephosphorylation, and protein transport.

The activation of the OnfD-mediated NF production under salt stress is necessary for a successful symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. To determine the symbiotic importance of the OnfD regulator, the symbiotic interactions of CIAT 899 and the *onfD* mutant on *P. vulgaris*, *L. japonicus*, and *L. burtii* were analyzed (Fig. 4A). In our previous study, the absence of NodD1 was enough to abolish nodulation in *L. japonicus*, while the absence of both NodD1 and NodD2 resulted in a lack of nodules in *P. vulgaris* and *L. burtii* roots (16, 21). In line with these previous results, we obtained two new CIAT 899 double-mutant strains for the *onfD-nodD1* and *onfD-nodD2* genes. The

TABLE 2 Fold change values of the *R. tropici* CIAT 899 genes located downstream of functional *nod* boxes

NB	Locus tag/gene(s)	Function	Fold change ^a					
			CIAT 899 apigenin (12)	<i>nodD2</i> mutant apigenin (21)	<i>onfD</i> mutant apigenin (this study)	CIAT 899 salt (12)	<i>nodD2</i> mutant salt (21)	<i>onfD</i> mutant salt (this study)
1	RTCIAT899_PB1300 to RTCIAT899_PB01340/ <i>nodABC</i> / <i>SUIJH</i>	NF production	8.73 to 3.09	10.85 to 1.73	6.97 to 1.45	13.66 to 7.6	-1.12 to -1.74	-1.43 to -1.30
2	RTCIAT899_PB01095 to RTCIAT899_PB01110/ <i>nodA2</i>	NF production	10.3 to 10.37	8.29 to 6.34	9.07 to 6.73	9.81 to 11.94	1.07 to 1.46	-1.42 to -1.30
	<i>hsnT nodFE</i>							
3	RTCIAT899_PB02710/ <i>nodM</i>	NF production	2.43	2.79	7.29	5.85	1.31	1.08
4	RTCIAT899_PB00575 to RTCIAT899_PB00565/ <i>y4wEF</i>	Synthesis of IAA	8.57 to 3.2	4.25 to -1.83	5.16 to 3.50	12.17 to 7.11	-1.12 to -1.3	-1.64 to -1.49
5	RTCIAT899_PB01550 to RTCIAT899_PB01545/HP	Unknown	6.75 to 4.26	4.1 to 2.35	2.46 to 1.91	28.65 to 14.37	1.96 to 1.42	1.14 to 1.04
9	RTCIAT899_PB01570/ <i>nodD2</i>	Transcriptional regulation	-1.25	1.10	1.10	3.01		-1.28

^aTranscriptional activation (≥ 2 -fold induction with respect to CIAT 899 noninduced cultures) of several NB-controlled operons was demonstrated by RNA-seq experiments in the presence of both inducer molecules (dark gray boxes). Slight transcriptional changes (≥ 2 -fold induction/ ≤ 3 -fold induction) are highlighted in light gray. HP, gene that codes for a hypothetical protein. Source references are indicated in parentheses.

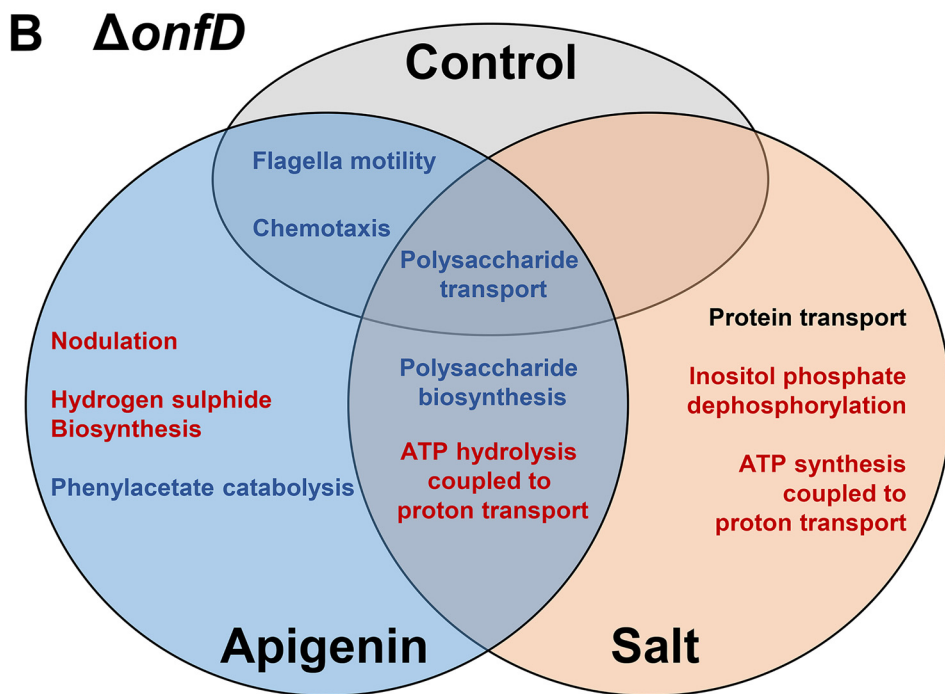
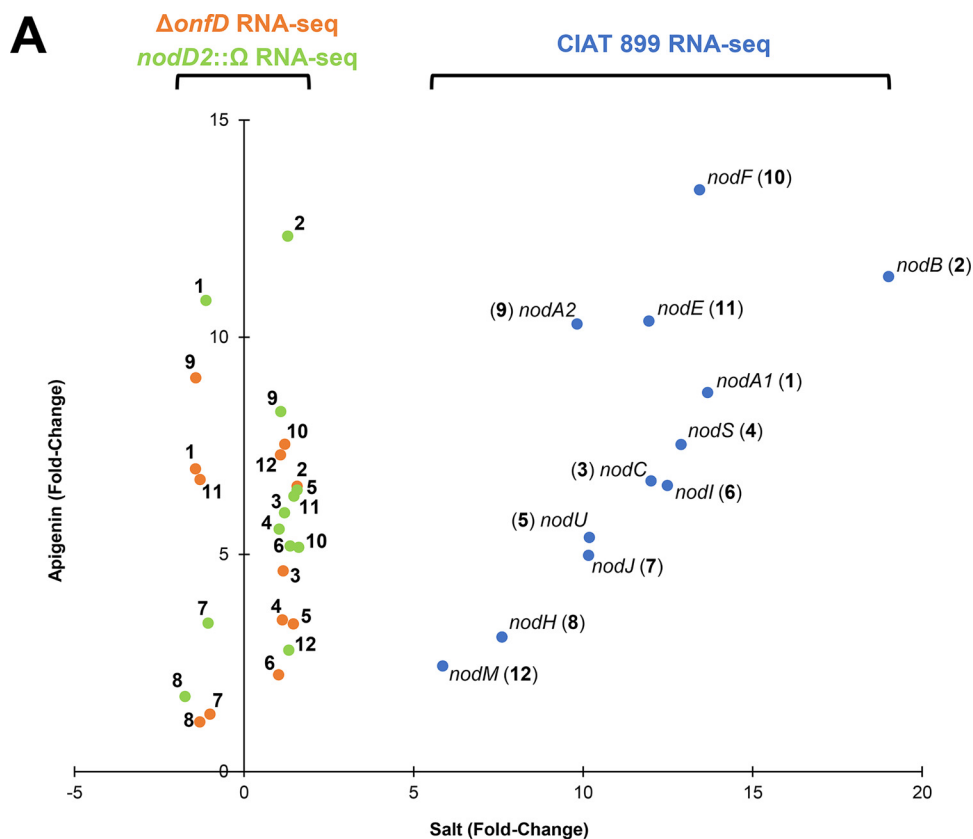


FIG 3 (A) Scatterplot representing the fold change values of the *nod* genes differentially expressed obtained in the RNA-seq assays from *R. tropici* CIAT 899 and *onfD* and *nodD2* mutants. Vertical and horizontal axis represent the values obtained in apigenin and salt conditions, respectively. Blue and light green circles represent the fold changes in our previous RNA-seq studies of the *R. tropici* CIAT 899 and *nodD2* mutant strains, respectively (12, 21). Orange circles represent the fold change levels observed in RNA-seq of the *onfD* mutant. (B) Venn diagram showing the biological processes differentially upregulated (in red), downregulated (in blue), or both (in black) in the *onfD* mutant in the presence or in the absence of apigenin and salt. The statistically overrepresented biological processes are from the data available at the UniProt database (GO) (see Data Set S3 in the supplemental material).

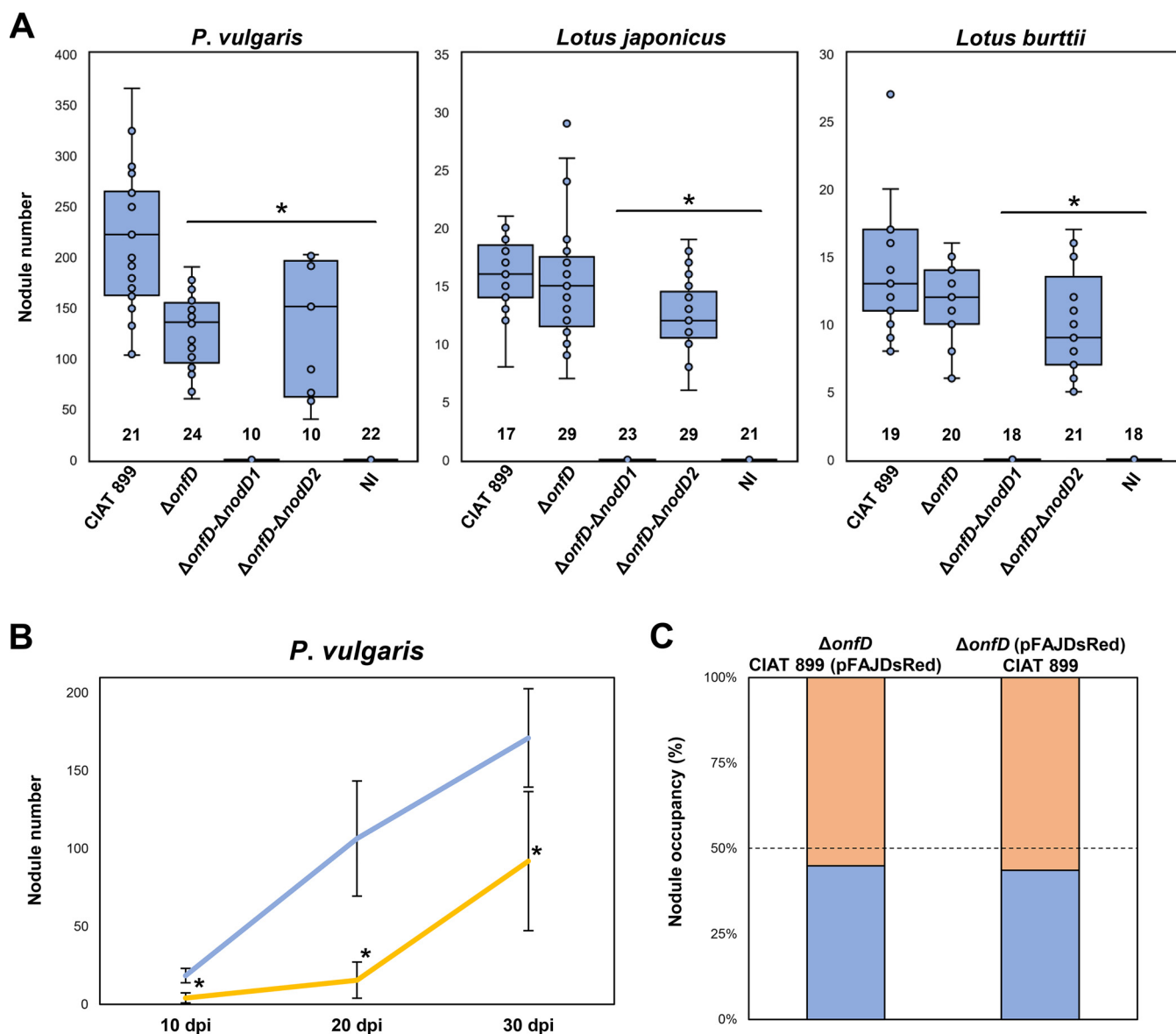


FIG 4 (A) Plant responses to inoculation of common bean and *Lotus* plants with different *R. tropici* CIAT 899 strains. *P. vulgaris* plants were evaluated 30 days postinfection (dpi). *Lotus* plants were evaluated 45 dpi. Parameters were individually compared to that obtained with the parental strain CIAT 899 by using the Mann-Whitney nonparametric test. Values tagged with an asterisk (*) are significantly different ($\alpha = 5\%$). The *n* value (number of plants assayed per strain) is indicated within bars. Error bars represent the standard deviations of data. Dots correspond to nodule number developed for each individual plant inoculated with different *R. tropici* CIAT 899 strains. (B) Nodulation kinetics of *P. vulgaris* inoculated with *R. tropici* CIAT 899 and its *onfD* mutant. Eight to sixteen plants were analyzed for determining nodule number per plant at each point of the time course experiments. The mutant nodule number (orange line) was individually compared to that obtained for the wild-type strain (blue line) by using a Mann-Whitney nonparametric test. Values tagged with asterisks (*) are significantly different at the level of $\alpha = 5\%$. Error bars represent the standard deviations of data. (C) Competition for nodulation assays of *R. tropici* CIAT 899 and its *onfD* mutant derivative in *P. vulgaris*. Percentages of nodule occupancy were evaluated for both strains harboring (or not) the pFAJDsRed plasmid at 30 dpi.

number of nodules in the two examined *Lotus* plants inoculated by the *onfD* mutant was not statistically different from those obtained in the parental strain CIAT 899, unless both NodD2/OnfD were absent, where significantly fewer nodules were observed. In contrast, both *onfD* and *onfD-nodD2* mutants presented a significantly reduced number of nodules in *P. vulgaris* in comparison to those plants inoculated with the parental strain. Interestingly, as occurred with the *nodD1-nodD2* mutant (21), no plants inoculated with *onfD-nodD1* presented nodules, highlighting the similar roles of NodD2 and OnfD in the symbiotic process. In line with these results, a time course nodulation assay in *P. vulgaris* showed an early delay in the nodulation process of the $\Delta onfD$ strain in

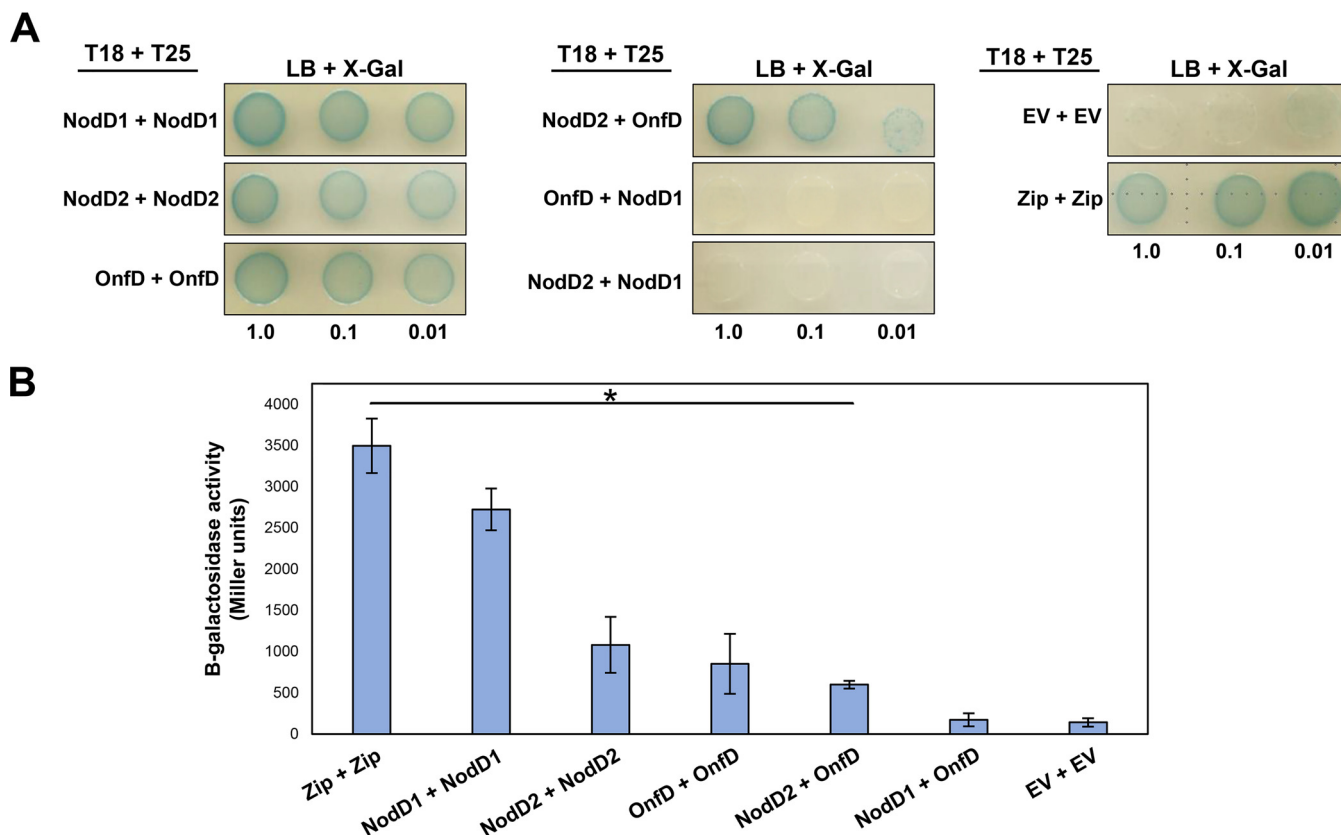


FIG 5 (A) Homo- and heterodimerization of *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD1, NodD2, and OnfD regulators. *E. coli* BTH101 (*cya*) was cotransformed with plasmids expressing the indicated T18 and T25 protein fusions. LacZ activity (blue) indicates protein-protein interaction. (B) Quantification of selected *E. coli* BTH101 (*cya*) cotransformants. The β -galactosidase activities were individually compared to that obtained with empty vector using a Mann-Whitney nonparametric test. Values tagged with asterisks (*) are significantly different at the level $\alpha = 5\%$. Zip, leucine zipper; EV, empty vector.

comparison with the parental strain (Fig. 4B). However, the abilities of both strains for occupying common bean nodules were similar in the nodulation (see Fig. S1 in the supplemental material) and in the competition for nodulation assays (Fig. 4C). Overall, results obtained from nodulation tests indicate that the NF induced by the OnfD protein of CIAT 899 are required for nodule formation in *P. vulgaris*.

OnfD forms dimers and interacts with NodD2 but not with NodD1. We investigated whether the NodD1, NodD2, and OnfD proteins were able to homo- and/or heterodimerize, a property required for the transcriptional activation ability of these regulators (26–28, 44). We used a bacterial two-hybrid system that depends on the reconstitution of adenylate cyclase activity, which is coupled with high β -galactosidase activity. The restoration of the adenylate cyclase activity is triggered by the interaction of two catalytic T25 and T18 subdomains in an adenyl cyclase deletion mutant background (*E. coli cya* strain) (45). After generating the fusion of our proteins of interest with the T25 and T18 subdomains, the results showed that NodD1, NodD2, and OnfD regulators form homodimers and/or homopolymers (tetramers, octamers, etc.) (Fig. 5A). As a positive control, we used the leucine zipper fused to the two subdomains of adenylate cyclases T25 and T18. The empty vectors harboring the T25 and T18 subdomains alone were used as negative controls of low adenylate cyclase activity levels. By using the same bacterial two-hybrid system, the interactions among NodD1, NodD2, and OnfD were also determined (Fig. 5A). Here, the OnfD-NodD2 two-hybrid combinations reconstitute adenylate cyclase activity, which indicates that both regulatory proteins may form a heterocomplex. In contrast, the interaction between NodD1-OnfD and NodD1-NodD2 was not detected. The formation of NodD2 and OnfD heterodimers was confirmed and quantified by β -galactosidase assays, displaying no

significant differences among binding affinities regarding their respective homodimers (Fig. 5B). These results suggest that OnfD and NodD2 may be acting together during the upregulation of the *nod* genes under salt stress conditions.

A structural model of OnfD predicts the presence of DNA-binding, ligand-binding, and dimerization domains. To understand how OnfD acts during *nod* gene activation and NF synthesis under salt stress conditions, a prediction of the OnfD secondary structure on the basis of its amino acid sequence was determined (see Fig. S2 in the supplemental material). Surprisingly, the secondary structure of OnfD aligns with the structures of two phylogenetically distanced AraC-type proteins, CuxR protein from *S. meliloti* and ToxT from *V. cholerae*, despite their low amino acid sequence conservation (CuxR versus OnfD = 23.35% identity; ToxT versus OnfD = 27.59% identity) (see Fig. S2). We selected CuxR and ToxT because these proteins have known structures, determined by X-ray crystallography (ToxT PDB 3BG6 and CuxR PDB 5NLA). We created two structural models of OnfD by using the CuxR and ToxT structures as references (see Fig. S3). In both OnfD models, we determined the presence of a putative DNA-binding (C-term) and a putative ligand-binding (N-term) domain composed of helix-turn-helix (HTH) and β -strands domains, respectively. These domains are typically present within the AraC family of regulators, and they may explain to some extent the role of OnfD in the activation of a different set of symbiotic genes under osmotic stress conditions. Moreover, the structural model of OnfD that used CuxR as a template showed one interesting finding: the presence of a hairpin domain composed of two α -helices that correspond with a dimerization domain of CuxR. This is another common feature of the AraC-type regulators that may explain the OnfD homodimerization ability observed in bacterial two-hybrid assays (Fig. 5).

DISCUSSION

R. tropici CIAT 899 is one of the most important microsymbionts of *P. vulgaris* and is characterized by its ability to produce a large variety of NF not only in the presence of inducing flavonoid (3.7 μ M apigenin) but also under osmotic stress conditions (300 mM salt and 400 mM mannitol) by means of the regulator proteins NodD1 and NodD2, respectively (15–17, 21, 22, 46–49). The activation patterns of the symbiotic genes are quite similar in the presence of both apigenin and salt since most of the CIAT 899 NB-controlled genes are activated at similar levels (12). An exception is found in genes located downstream of NB9, *nodD2* and RTCIAT899_PB01075 (coding for an AraC-type regulator, renamed as OnfD), which are only activated under salt stress conditions. The transcriptional activation of both genes is absent in a *nodD1* mutant background, suggesting that NodD1 is somehow required for the upregulation of both *nodD2* and *onfD* genes (21, 22). However, how salt is inducing the activation of the NodD2 protein and the mechanism by which NodD1 increases the total cytoplasmatic amount of both NodD2 and OnfD proteins remain unknown. According to results presented here, answers to these questions might be explained by the action of OnfD.

In our study, we have determined that OnfD is involved, like NodD2, in the transcriptional activation of the CIAT 899 symbiotic genes and in the synthesis of symbiotically active NF under salt stress conditions. First, we demonstrated that the activation of the CIAT 899 *nodA1* and *nodA2* promoters in the presence of salt or mannitol requires a functional OnfD, which correlates with the absence of NF overproduction under this stressing condition in the *onfD* mutant background (Fig. 2). Next, RNA-seq studies confirm the role of OnfD in the general activation of all previously defined CIAT 899 symbiotic genes in the presence of salt, since this upregulation was detected in the presence of apigenin but not with salt in the Δ *onfD* genetic background (Table 2 and Fig. 3). This regulatory role of OnfD is correlated with the presence of a putative DNA-binding domain in its structure, as shown in the structural model (see Fig. S3).

In the absence of OnfD, the activation patterns of these symbiotic genes were qualitatively and quantitatively similar to those previously reported for the *nodD2* mutant in the presence of salt and apigenin (21). This phenotypic parallelism between

onfD and *nodD2* mutants is not restricted to NF production or transcriptomic profiles but is also evident for symbiotic behaviors: the absence of the OnfD protein was detrimental for nodulation with *P. vulgaris* but not with *Lotus* plants (Fig. 4A), in the same manner as for the *nodD2* mutant (16). This symbiotic phenotype observed in common bean seems to be the consequence of an early delay in the nodulation process of the *onfD* mutant (Fig. 4B) since competitiveness and nodule occupancy abilities are similar in both wild-type and mutant strains (Fig. 4C). However, identical behaviors in competition for nodulation assays might be the consequence of phenotypic complementation in the production of NF under osmotic stress conditions mediated by the wild-type strain. The role of another AraC-type regulator in symbiosis has also been briefly reported for *S. fredii* NGR234 since complementation with *orf816* and *nodD3* genes of *Rhizobium* sp. BR816 restored nodulation ability to a higher level compared to complementation with *nodD3* alone (42). Interestingly, the implication of OnfD and ORF816 in symbiosis also correlates with their proximity in our phylogenetic analysis (Fig. 1A), which might indicate a similar mechanism for both regulator proteins.

Results obtained in the bacterial two-hybrid assays are key to understanding how NodD2 and OnfD may be acting to activate the *nod* genes under osmotic stress conditions. Taking into consideration that OnfD forms homodimers and heterodimers with NodD2 and that AraC-type regulators play a dual role in controlling the expression target genes (as activators in the presence of ligand but as repressors in their absence) (26–32), we propose the following model of regulation of the *R. tropici* CIAT 899 *nodD2* and *onfD* genes and their role in the activation of the symbiotic genes under salt stress conditions (see Fig. S4 in the supplemental material). In the absence of salt, one monomer of the OnfD dimer would occupy the *onf1* site identified in the promoter region of *onfD*, while the other would occupy the *onfO2* site located at the end of the previous ORF, the *nodD2* gene, leading to the formation of a DNA loop that would be blocking the basal transcriptional activation of the *onfD* and *nodD2* genes (see Fig. S4A). Under salt stress conditions, rhizobia accumulate intracellular compatible solutes such as sugars (sucrose, trehalose, maltose, cellobiose, turanose, gentiobiose, and palatinose), amino acids (mainly glutamate, glycine and proline), imino acids (pipecolate), ectoin, betaine, stachydrin, *N*-acetylglutaminylglutamine amide, and dimethylsulfoniopropionate (50). In fact, a study in *R. tropici* CIAT 899 demonstrated that this bacterium accumulates trehalose, mannitol and glutamate under salt stress (51). Therefore, one of these compatible solutes could act as a ligand and bind to OnfD, generating a conformational change that would lead to the occupancy of the inducer sites *onf1* and *onf2* and the induction of the *onfD* promoter (see Fig. S4B). Then, recruitment of the RNA polymerase by the dimeric and activated OnfD would be facilitated by the basal, but previously interrupted, transcription of the *nodD2* gene mediated by the NodD1 protein. As a consequence of this upregulation, the total cytoplasmic amounts of both OnfD and NodD2 proteins would increase simultaneously in the presence of salt, allowing the formation of OnfD-NodD2 heterodimers. These heterodimers would bind to active NB, promoting the transcriptional activation of the *R. tropici* CIAT 899 symbiotic genes in the absence of inducing flavonoids. Thus, the lower rates of activation of these genes in the *nodD1* mutant with respect to the wild-type strain under salt conditions described in del Cerro et al. (21) could be explained by the low cytoplasmic levels of NodD2 and OnfD. Our future efforts will be focused to validate (or deny) this model and to understand the implication of the osmotic stress-activated *nod* gene inductions during the symbiotic process.

In conclusion, we have demonstrated here that an AraC-type protein from a rhizobial strain, *R. tropici* CIAT 899, is directly involved in the transcriptional activation of the symbiotic genes and in the synthesis of symbiotically active NF under salt stress conditions. This mechanism seems to be widespread among rhizobia, since OnfD homologous regulators are present in strains phylogenetically related to CIAT 899 (Fig. 1). In addition to its role in nodulation, OnfD seems to be involved in the regulation of other biological processes, in the presence and absence of salt, which highlights the value of this regulator in some aspects of the *R. tropici* CIAT 899 way of life.

TABLE 3 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Derivation and relevant properties	Source or reference
Strains		
<i>R. tropici</i>		
CIAT 899	Wild-type strain (Rif ^r)	17
$\Delta onfD$	CIAT 899 <i>onfD</i> deletion mutant	This study
$\Delta onfD \Delta nodD1$	CIAT 899 $\Delta onfD \Delta nodD1$ double deletion mutant	This study
$\Delta onfD \Delta nodD2$	CIAT 899 $\Delta onfD \Delta nodD2$ double deletion mutant	This study
$\Delta onfD$ comp	CIAT 899 derivative strain that harbors both wild-type and deletion mutant versions of the <i>onfD</i> gene	This study
CIAT 899(pMP240)	<i>R. tropici</i> CIAT 899 carrying plasmid pMP240 (Tc ^r)	81
$\Delta onfD$ (pMP240)	CIAT 899 <i>onfD</i> mutant carrying plasmid pMP240 (Tc ^r)	This study
$\Delta onfD$ comp(pMP240)	CIAT 899 <i>onfD</i> complemented carrying plasmid pMP240 (Tc ^r)	This study
CIAT 899(pMP220::PnodA1)	CIAT 899 carrying plasmid pMP220::PnodA1 (Tc ^r)	This study
CIAT 899(pMP220::PnodA2)	CIAT 899 carrying plasmid pMP220::PnodA2 (Tc ^r)	This study
$\Delta onfD$ (pMP220::PnodA1)	CIAT 899 <i>onfD</i> mutant carrying plasmid pMP220::PnodA1 (Tc ^r)	This study
$\Delta onfD$ (pMP220::PnodA2)	CIAT 899 <i>onfD</i> mutant carrying plasmid pMP220::PnodA2 (Tc ^r)	This study
CIAT 899(pFAJDsRed)	CIAT 899 carrying plasmid pFAJDsRed (Tc ^r)	This study
$\Delta onfD$ (pFAJDsRed)	CIAT 899 <i>onfD</i> mutant carrying plasmid pFAJDsRed (Tc ^r)	This study
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44 \Delta lacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i> (Nal ^r)	52
BTH101	<i>F' cya-99 araD139 galE15 galK16 rpsL1</i> (Str ^r) <i>hsdR2 mcrA1 mcrB1</i>	45
Plasmids		
pRK2013	Helper plasmid (Km ^r)	82
pMP220	Cloning vector (Tc ^r)	65
pMP220::PnodA1	pMP220 plasmid carrying the transcriptional fusion between the <i>R. tropici nodA1</i> promoter and the <i>lacZ</i> gene (Tc ^r)	This study
pMP220::PnodA2	pMP220 plasmid carrying the transcriptional fusion between the <i>R. tropici nodA2</i> promoter and the <i>lacZ</i> gene (Tc ^r)	This study
pMP220::PnodA3	pMP220 plasmid carrying the transcriptional fusion between the <i>R. tropici nodA3</i> promoter and the <i>lacZ</i> gene (Tc ^r)	This study
pMP240	pMP220 plasmid carrying the transcriptional fusion between the <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 65 <i>nodA</i> promoter and the <i>lacZ</i> gene (Tc ^r)	65
pK18 <i>mobsacB</i>	Cloning vector, suicide plasmid in rhizobia (Km ^r)	83
pK18 <i>mobsacB</i> :: $\Delta onfD$	pK18 <i>mobsacB</i> plasmid carrying the deleted version of the <i>onfD</i> gene (Km ^r)	This study
pK18 <i>mobsacB</i> :: $\Delta nodD1$	pK18 <i>mobsacB</i> plasmid carrying the deleted version of the <i>nodD1</i> gene (Km ^r)	21
pK18 <i>mobsacB</i> :: $\Delta nodD2$	pK18 <i>mobsacB</i> plasmid carrying the deleted version of the <i>nodD2</i> gene (Km ^r)	21
pUT18	<i>B. pertussis cya</i> T18-expression plasmid (Km ^r)	45
pUT18C	<i>B. pertussis cya</i> T18C-expression plasmid (Km ^r)	45
pKT25	<i>B. pertussis cya</i> T25-expression plasmid (Km ^r)	45
pKNT25	<i>B. pertussis cya</i> NT25-expression plasmid (Km ^r)	45
pUT18C-zip	<i>B. pertussis cya</i> T18C-leucine zipper fusion (Km ^r)	45
pKT25-zip	<i>B. pertussis cya</i> T25-leucine zipper fusion (Km ^r)	45
pUT18:: <i>nodD1</i>	<i>B. pertussis cya</i> T18-NodD1 fusion (Km ^r)	This study
pUT18C:: <i>nodD1</i>	<i>B. pertussis cya</i> T18C-NodD1 fusion (Km ^r)	This study
pKT25:: <i>nodD1</i>	<i>B. pertussis cya</i> T25-NodD1 fusion (Km ^r)	This study
pKNT25:: <i>nodD1</i>	<i>B. pertussis cya</i> NT25-NodD1 fusion (Km ^r)	This study
pUT18C:: <i>nodD2</i>	<i>B. pertussis cya</i> T18-NodD2 fusion (Km ^r)	This study
pUT18:: <i>nodD2</i>	<i>B. pertussis cya</i> T18C-NodD2 fusion (Km ^r)	This study
pKT25:: <i>nodD2</i>	<i>B. pertussis cya</i> T25-NodD2 fusion (Km ^r)	This study
pKNT25:: <i>nodD2</i>	<i>B. pertussis cya</i> NT25-NodD2 fusion (Km ^r)	This study
pUT18C:: <i>onfD</i>	<i>B. pertussis cya</i> T18-OnfD fusion (Km ^r)	This study
pUT18:: <i>onfD</i>	<i>B. pertussis cya</i> T18C-OnfD fusion (Km ^r)	This study
pKT25:: <i>onfD</i>	<i>B. pertussis cya</i> T25-OnfD fusion (Km ^r)	This study
pKNT25:: <i>onfD</i>	<i>B. pertussis cya</i> NT25-OnfD fusion (Km ^r)	This study

MATERIALS AND METHODS

Bacterial growth conditions, plasmids, and construction of mutants. All strains and plasmids used in this work are listed in Table 3. In general, *Escherichia coli* strains were cultured on LB medium (52) at 37°C. *E. coli* BTH101 (*cya*) strains were grown at 30°C (45). *R. tropici* CIAT 899 strains were grown at 28°C on tryptone yeast extract (TY) medium (53), B- minimal medium (54) or yeast extract mannitol (YM) medium (55), supplemented when necessary with 3.7 μ M apigenin, 300 mM NaCl, or 400 mM mannitol. When required, media were supplemented with the appropriate antibiotics as previously described (5). The $\Delta onfD$ and the double $\Delta onfD \Delta nodD1$ and $\Delta onfD \Delta nodD2$ deletion mutants were constructed by overlapping PCR extension, as previously described (57), where 765-, 819-, and 885-bp DNA fragments were deleted from *onfD*, *nodD1*, and *nodD2*, respectively. The deleted DNA fragments were

TABLE 4 Primers used in this study

Primer	Nucleotide sequence (5'–3')	Use
onfD-A	ATAGGATCCTGAACGCTTTGAGTGGGTG	Mutagenesis
onfD-B	TCCCTCGTTGTATGCGCGGCTTTATACT	Mutagenesis
onfD-C	AGTATAAAGCCGCGCATACAACGAGGGA	Mutagenesis
onfD-D	AAATCTAGAAAAGATGGTCATAGAGGAGGC	Mutagenesis
PnodA1-F	GAGGAATTCCTTTCTTCATTCAAGA	Cloning in pMP220 vector
PnodA1-R	TCTAGAGCAAAGACCTCCTTTTTTC	Cloning in pMP220 vector
PnodA2-F	GAGGAATTCCTTTCTTCATTCAAGA	Cloning in pMP220 vector
PnodA2-R	TCTAGAGCAAAGATCTCCTCTTCC	Cloning in pMP220 vector
PnodA3-F	AGAGAATTCACACTCTCTGCTCACCAT	Cloning in pMP220 vector
PnodA3-R	TCTAGATCAAAGACCTCCTTTTTTC	Cloning in pMP220 vector
Hyb_onfD-F	AGAGGATCCCATGTTTCAAAGCAGCAGC	Cloning in two-hybrid vectors
Hyb_onfD-R	GAGGGTACCGCTCTGCGCAAGATTGAATG	Cloning in two-hybrid vectors
Hyb_nodD1-F	AGAGGATCCCATGCGCTTCAAAGGACTG	Cloning in two-hybrid vectors
Hyb_nodD1-R	GAGGGTACCGCATGCTCTGCCGACGGGAG	Cloning in two-hybrid vectors
Hyb_nodD2-R	AGAGGATCCCATGCGTTTCAAAGGCTCTT	Cloning in two-hybrid vectors
Hyb_nodD2-R	GAGGGTACCGCAATGCTACTTTCCGCGACA	Cloning in two-hybrid vectors
q_nodD1 F	CACGGTCGCTATGCGATTGGTA	qRT-PCR
q_nodD1 R	GTCGCGGCCAAATTCGGGAA	qRT-PCR
q_nodA2 F	GGGATTGTACGGGATACGCACCG	qRT-PCR
q_nodA2 R	CGTGCAGAAAACCGTACAGG	qRT-PCR
q_nodM F	TTGCAATAGCGTAGGCAAGC	qRT-PCR
q_nodM R	TGATGTCGCTCCGAATTTTC	qRT-PCR
q_nodB F	ACAAGGTCGCAATCACCA	qRT-PCR
q_nodB R	GCGCATATATTGCACCGA	qRT-PCR
q_y4wF F	CACCAGGCTGCTATGCGGAA	qRT-PCR
q_y4wF R	GGGTCTACCTGTGGCAATCCA	qRT-PCR
q_PB01550 F	TGAACTTGAAGGAAGCGCG	qRT-PCR
q_PB01550 R	TCGACGTGGCAAGGCATTAT	qRT-PCR
q_nodD2 F	AAAGCGTCTGGCAAGGGAAG	qRT-PCR
q_nodD2 R	TTTTCTGCGAACAGCTTCGC	qRT-PCR
q_16S F	ACACACGTGCTACAATGGTG	qRT-PCR
q_16S R	GCGATTACTAGCGATTCCAA	qRT-PCR
RT_nodD1 F	CACGGTCGCTATGCGATTGGTA	Cotranscription assays
RT_nodA1 R	ATGCCCGATCCCCAATCCCT	Cotranscription assays
RT_nodA1 F	TGATGCTAATGGTGTGTCGCGGC	Cotranscription assays
RT_nodB R	GCGCATATATTGCACCGA	Cotranscription assays
RT_nodD2 F	AAAGCGTCTGGCAAGGGAAG	Cotranscription assays
RT_onfD R	CGTTGATGGTAGGCTGGATT	Cotranscription assays

first cloned into the pK18*mobsacB* vector, obtaining plasmids pK18*mobsacB*::*ΔonfD* (this study) and pK18*mobsacB*::*ΔnodD1* and pK18*mobsacB*::*ΔnodD2* (21). Then, the plasmids were transferred by conjugation and integrated in the genome of CIAT 899 by single recombination. Finally, a double homologue recombination event in which the wild-type copy of the gene, together with plasmid pK18*mobsacB*, was lost was selected. Mutated strains were confirmed by PCR and DNA-DNA hybridization (data not shown). For hybridization, DNA was blotted to Hybond-N nylon membranes (Amersham, Little Chalfont, UK), and the DigDNA method of Roche (Basel, Switzerland) was used according to the manufacturer's instructions. In *cis* complementation of the *onfD* mutant was performed by integration of the plasmid pK18*mobsacB*::*ΔonfD* into the genome of CIAT 899, obtaining a derivative strain that harbors both the wild-type and the deletion mutant version of the *onfD* gene. Promoter regions (from the start codon to the stop codon of the previous gene) of the two different CIAT 899 *nodA* genes were amplified with specific primers (327 and 491 bp, respectively) and cloned into plasmid pMP220 upstream of the *lacZ* gene (58), obtaining plasmids pMP220::P_{nodA1} and pMP220::P_{nodA2}. The CIAT 899 OnfD, NodD1, and NodD2 coding sequences were also cloned into pUT18, pUT18C, pKT25, and pKNT25 plasmids to fuse them to T18 and T25 subdomains in *Bordetella pertussis cya* at both the N-terminal and the C-terminal ends (45). Plasmid pFAJDSRed, which harbors a gene for red fluorescence, was also introduced in CIAT 899 and the *ΔonfD* derivative (59). All plasmids were transferred from *E. coli* to CIAT 899 by conjugation as previously described using plasmid pRK2013 as helper (60). Recombinant DNA techniques were performed according to the general protocols of Sambrook et al. (52). PCR amplifications were performed as previously described (61). Primers used in this study are listed in Table 4.

Phylogenetic tree construction. The phylogenetic tree was obtained using the software MEGA7 (62). Amino acid sequences of each AraC-type regulator were first aligned by MUSCLE (63). The evolutionary distances were computed using the maximum-likelihood method (64). All positions containing gaps and missing data were eliminated. The bootstrap value for this tree was 500.

Determination of β -galactosidase activity. To determine the β -galactosidase activity, plasmid pMP240, which contains a transcriptional fusion between the *R. leguminosarum* bv. *viciae* *nodA* promoter and the *lacZ* gene, and the plasmids pMP220::P_{nodA1} and pMP220::P_{nodA2}, which contain transcriptional

fusions between the different CIAT 899 *nodA1* and *nodA2* promoters and the *lacZ* gene, were transferred by conjugation to the wild-type, mutant, and complemented strains (65). Assays of β -galactosidase activity were carried out as described by Zaat et al. (66). Units of β -galactosidase activity were calculated according to the method of Miller (67). The experiments were repeated three times with six replicates each time.

RP-TLC analysis of NF. RP-TLC analyses were performed according to Spaink et al. (68). Briefly, *R. tropici* CIAT 899 was grown on B- minimal medium, supplemented when necessary with inducing molecules. For the radiolabeling of Nod factors, 0.2 μ Ci of *N*-acetyl-D-[1- 14 C]-glucosamine (specific activity, 0.05 mCi) (Perkin-Elmer, Waltham, MA) was used. Cultures (1 ml) were grown to the end of the exponential growth phase, and the supernatant was extracted with water-saturated butanol. The butanol fraction was evaporated to dryness, and the resulting powder dissolved in 40 μ l of water-saturated butanol. This solution (10 μ l) was applied to the TLC plate (RP-18F254S; Merck, Darmstadt, Germany), where the Nod factors were separated with 50% acetonitrile/H₂O (vol/vol) as the mobile phase. TLC plates were exposed to a Fuji BAS-III film for 10 days, and the image was digitalized using a phosphor-image system (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Identification of NF. The chemical identification of the NF was carried out by using an ultrahigh-pressure liquid chromatography system connected to a mass spectrometer (UHPLC-MS/MS) as previously described after growing the wild-type and the derivative mutant strains in B- minimal medium, supplemented when required with 300 mM NaCl or 3.7 μ M apigenin (22).

RNA and DNA extraction. The *R. tropici* strains were grown at 28°C until stationary phase (optical density at 600 nm \approx 1.2) on TY medium, supplemented when required with 300 mM NaCl or 3.7 μ M apigenin. Total RNA was isolated using a High Pure RNA isolation kit (Roche, Basel, Switzerland) according to the manufacturer's instructions. Verification of the amount and quality of total RNA samples was carried out using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA) and a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA). Two independent total RNA extractions were obtained for each condition. Genomic DNA (gDNA) was isolated using an i-genomic CTB DNA Extraction minikit (Intron, Gyeonggi-Do, South Korea) according to the manufacturer's instructions.

RNA sequencing, mapping of the RNA-seq data, assessment of differentially expressed genes, and functional categorization of genes. rRNA was depleted using a MICROB Express bacterial mRNA purification kit (Ambion, Thermo Scientific), following the manufacturer's protocol. The integrity and quality of the ribosome-depleted RNA were checked with an Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). RNA sequencing was carried out by Sistemas Genómicos (Valencia, Spain) with the Illumina next-generation sequence (NGS) platform using the Illumina HiSeq 2000 sequencing instrument (Illumina, San Diego, California). Ribosome-depleted samples were used to generate whole-transcriptome libraries according to the manufacturer's recommendations for sequencing on this NGS platform. Amplified cDNA quality was analyzed by the Bioanalyzer 2100 DNA 1000 kit (Agilent Technologies) and quantified by using a Qubit 2.0 fluorometer (Invitrogen, Thermo Scientific). The RNA-seq data discussed in this work are deposited in the Sequence Read Archive of NCBI under the accession numbers [PRJNA605332](#) (this work), [PRJNA470887](#), [PRJNA326592](#), and [PRJNA305690](#). The initial whole-transcriptome paired-end reads obtained from sequencing were mapped against the latest version of the *R. tropici* CIAT 899 genome deposited in NCBI ([ASM33088v1](#)) using the Life Technologies mapping algorithm version 1.3. Low-quality reads were eliminated using Picard Tools software version 1.83, retaining only high-quality reads. Gene prediction was estimated using the cufflinks method (69), and the expression levels were calculated using the HTSseq software, version 0.5.4p3 (70). This method eliminates multimapped reads, considering only unique reads for the gene expression estimation. The edge method version 3.2.4 was applied for differential expression analysis among conditions (71). This method uses a Poisson model to estimate the variance of the RNA-seq data for differential expression and relies on different normalized processes based on depth global samples, CG composition, and lengths of genes. Differential expression was established for those genes with a fold change lower or higher than -3 or 3 , respectively, with a *P* value adjusted to 0.05. To assign statistically overrepresented functional categories in the presence of both *nod* gene-inducing molecules, an enrichment functional study was performed. Thus, genes were annotated using UniProt databases, and a hypergeometrical test using all genes as background and differential gene expression as the gene group of interest was applied (72). This statistical test calculates the statistical significance using *P* values (73), in this case evaluating the significance of functional categories. Those functional categories (biological processes) with a *P* value inferior to 0.1 (*P* adjusted) were considered overrepresented.

Quantitative reverse transcription-PCR and cotranscription assays. Results obtained in the RNA-seq analysis were validated by qRT-PCR of seven selected nodulation genes which represented differentially and non-differentially expressed genes in the presence of apigenin and salt. Total RNA was isolated using a High Pure RNA isolation kit (Roche), according to the manufacturer's instructions. This (DNA-free) RNA was reverse transcribed into cDNA by using a PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (TaKaRa, Kusatsu, Japan). Quantitative PCR was performed using a LightCycler 480 (Roche) under the following conditions: 95°C for 10 min and then 40 cycles of 95°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 20 s, followed by the melting curve profile from 60 to 95°C to verify the specificity of the reaction. The *R. tropici* CIAT 899 16S rRNA gene was used as an internal control to normalize gene expression. The fold changes of two biological samples with three technical replicates of each condition were obtained using the $\Delta\Delta C_T$ method (74). Selected genes and primers are listed in Table 4.

To ensure that genomic DNA was not present in RNA samples in cotranscription assays, a control PCR was done employing primers showed in Table 4. Only those RNA samples showing no PCR amplification were selected for further work. Retrotranscription of total RNA was carried out using the PrimeScript RT

reagent kit (TaKaRa), which includes a genomic DNA elimination step (gDNA Eraser) before RNA retrotranscription. PCR amplifications were performed as previously described (12). Primer pairs used for amplifying fragments of the *R. tropici* CIAT 899 *nodD2-onfD* region are shown in Table 4.

Bacterial two-hybrid studies. We used DNA sequences encoding OnfD, NodD1, and NodD2 to create fusions to the T18 and T25 catalytic subdomains of *B. pertussis* at both N-terminal and C-terminal ends. Bacterial two-hybrid studies were carried out as previously described (45). When appropriate monomers interact, the catalytic subdomains restore adenylate cyclase activity and cAMP synthesis, which were monitored by assaying a cAMP-regulated β -galactosidase reporter and confirmed by growth on M63 minimal medium (data not shown).

Protein alignment and modeling. The protein sequence and structure alignments were performed with PROMALS3D (75) and displayed with the Jalview software using the ClustalX coloring scheme (76). Models for OnfD were made with Phyre2 (77), a web server for protein modeling which uses homology detection methods to build three-dimensional models of proteins, using as a reference the structures of ToxT (PDB 3GBG) (78) and CuxR (PDB 5NLA) (38) proteins, previously determined by X-ray crystallography. Figures of the protein models were made with UCSF ChimeraX (79).

Plant tests. For the evaluation of the symbiotic phenotypes, the CIAT 899 strains were grown in YM medium until the concentration of 10^9 cells ml^{-1} . Surface-sterilized seeds of *P. vulgaris*, *L. burttii*, and *L. japonicus* were pregerminated and placed in sterilized jars (for *P. vulgaris*, Leonard jars) containing Farh eus N-free solution as previously described (16). Growth conditions were 16 h at 26°C in the light and 8 h at 18°C in the dark, with 70% humidity. Nodulation parameters were evaluated after 30 days for *P. vulgaris* or 45 days for *Lotus* plants. Nodulation experiments were performed twice.

Kinetics of nodulation experiments were carried out as follows. Leonard jars containing two sterilized *P. vulgaris* seedlings were prepared and inoculated with 1 ml of 10^9 cells ml^{-1} bacterial cultures. Plants inoculated with CIAT 899 parental and *onfD* mutant strains were grown in a plant growth chamber with a 16 h photoperiod at 25°C (light) and 18°C (darkness). Nodulation of eight plants was scored at 10, 20, and 30 days after inoculation. At least two independent experiments were carried out for each strain.

Competition for nodulation experiments on *P. vulgaris* were performed using wild-type and mutant strains harboring (or not) the pFAJDsRed plasmid, which provides red color to colonies (59). These bacteria were grown to 10^9 cells ml^{-1} , and four to five Leonard jar assemblies containing two *P. vulgaris* seedlings each were inoculated with 1 ml of a mixture of bacterial competitors in a 1:1 ratio. Plants were grown for 4 weeks in a plant growth chamber under the growth conditions described above. To identify bacteria occupying the nodules, bean nodules were surface sterilized by immersing them in bleach (1/5 dilution of a stock solution containing 14% [wt/vol] sodium hypochlorite) for 2 min, followed by five washing steps in sterilized distilled water. The effectiveness of the surface-sterilizing treatment was checked by inoculating TY plates with 20- μl aliquots from the last washing step. Individual surface-sterilized nodules were crushed in 30 μl of sterilized distilled water, and 20- μl aliquots were used to inoculate TY plates. Nodule occupancy was determined by assessing the ratio of red-colored nodule isolates. At least 10 colonies from each isolate were analyzed in order to check the possibility of nodules containing both inoculants.

For nodule occupancy visualization, 30-day-old *P. vulgaris* nodules formed in plants inoculated with CIAT 899 and CIAT ΔonfD strains carrying the DsRed fluorescent marker were embedded in 6% agarose in water and sliced in thick layer sections (30 μm) using a Leica VT 1000S vibratome (Wetzlar, Germany). Sections of nodules were stained with 0.04% calcofluor and observed by using a Zeiss ApoTome.2 (Jena, Germany) fluorescence microscope as previously described (80).

Data availability. Newly determined RNA-seq data in this study were deposited in the NCBI Sequence Read Archive under accession number [PRJNA605332](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA605332). Other RNA-seq data used here can be found under accession numbers [PRJNA470887](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA470887), [PRJNA326592](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA326592), and [PRJNA305690](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA305690).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 1.6 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 2, XLSX file, 2.9 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 3, XLSX file, 0.02 MB.

SUPPLEMENTAL FILE 4, XLSX file, 0.03 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Ministerio de Econom a y Competitividad of the Spanish government (project AGL2016-77163-R). P.D.C. and P.A.-G. received FPU fellowships (FPU14/00160 and FPU18/06248, respectively) of the Ministerio de Econom a y Competitividad. P.B. received a Garant a Juvenil grant from the Servicio P blico de Empleo Estatal.

We also acknowledge Juan Carlos Trevi o (Sistemas Gen micos S.L.) for help during all bioinformatic analysis. We thank Isabel D ez-Santos from the John Innes Centre for help improving the quality of the manuscript. Finally, we thank M.-T. Gallegos-Fern ndez from the Estaci n Experimental del Zaid n (CSIC) for help with promoter studies.

REFERENCES

- Oldroyd GE. 2013. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11:252–263. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2990>.
- Cooper JE. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol* 103:1355–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x>.
- Long SR. 2016. Snapshot: signaling in symbiosis. *Cell* 167:582–582. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.046>.
- Schlaman HRM, Phillips DA, Kondorosi E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes, p 361–386. In Spaiak HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ (ed), *The Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Dénarié J, Debelle F, Prome JC. 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65:503–535. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.002443>.
- Geurts R, Bisseling T. 2002. *Rhizobium* Nod factor perception and signaling. *Plant Cell* 14:S239–S249. <https://doi.org/10.1105/tpc.002451>.
- Janczarek M, Rachwał K, Marzec A, Grządziel J, Palusińska-Szys M. 2015. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Appl Soil Ecol* 85:94–113. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.08.010>.
- Acosta-Jurado S, Navarro-Gómez PDS, Murdoch P, Crespo-Rivas JC, Jie S, Cuesta-Berrio L, Ruiz-Sainz JE, Rodríguez-Carvajal MÁ, Vinardell JM. 2016. Exopolysaccharide production by *Sinorhizobium fredii* HH103 is repressed by genistein in a NodD1-dependent manner. *PLoS One* 11:e0160499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160499>.
- Krause A, Doerfel A, Göttfert M. 2002. Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact* 15:1228–1235. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.12.1228>.
- López-Baena FJ, Vinardell JM, Pérez-Montaño F, Crespo-Rivas JC, Bellogín RA, Espuny MR, Ollero FJ. 2008. Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology* 154:1825–1836. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/016337-0>.
- Pérez-Montaño F, Jiménez-Guerrero I, Del Cerro P, Baena-Ropero I, López-Baena FJ, Ollero FJ, Bellogín R, Lloret J, Espuny MR. 2014. The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, is regulated by quorum-sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. *PLoS One* 9:8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0105901>.
- Pérez-Montaño F, del Cerro P, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Cubo MT, Hungria M, Megías M, Ollero FJ. 2016. RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics* 17:198. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2543-3>.
- Theunis M, Kobayashi H, Broughton WJ, 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. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.10.1153>.
- Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, López-Baena FJ, Medina C, Ivanov-Vangelov K, Parada M, Madinabeitia N, Espuny M, d R, Bellogín RA, Camacho M, Rodríguez-Navarro D-N, Soria-Díaz ME, Gil-Serrano AM, Ruiz-Sainz JE. 2004. NoIR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Mol Plant Microbe Interact* 17:676–685. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.6.676>.
- del Cerro P, Rolla-Santos AA, Gomes DF, Marks BB, Pérez-Montaño F, Rodríguez-Carvajal MÁ, Nakatani AS, Gil-Serrano A, Megías M, Ollero FJ, Hungria M. 2015. 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. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1458-8>.
- del Cerro P, Rolla-Santos AA, Gomes DF, Marks BB, del Rosario Espuny M, Rodríguez-Carvajal MÁ, Soria-Díaz ME, Nakatani AS, Hungria M, Ollero FJ, Megías M. 2015. Opening the “black box” of *nodD3*, *nodD4*, and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics* 16:864. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2033-z>.
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Bacteriol* 41:417–426. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417>.
- Gomes DF, Ormeño-Orrillo E, Hungria M. 2015. Biodiversity, symbiotic efficiency, and genomics of *Rhizobium tropici* and related species, p 747–756. In de Bruijn FJ (ed), *Biological nitrogen fixation*, vol 2. Wiley, Hoboken, NJ.
- Hungria M, Andrade DDS, Chueire LMDO, Probanza A, Guttierrez-Mañero FJ, Megías M. 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol Biochem* 32:1515–1528. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00063-8).
- Ormeño-Orrillo E, Menna P, Almeida LG, Ollero FJ, Nicolás MF, Pains Rodrigues E, Shiguyoshi Nakatani A, Silva Batista JS, Oliveira Chueire LM, Souza RC, Ribeiro Vasconcelos AT, 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-735>.
- Del Cerro P, Pérez-Montaño F, Gil-Serrano A, López-Baena FJ, Megías M, Hungria M, Ollero FJ. 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. <https://doi.org/10.1038/srep46712>.
- del Cerro P, Megías M, López-Baena FJ, Gil-Serrano A, Pérez-Montaño F, Ollero FJ. 2019. Osmotic stress activates *nif* and *fix* genes and induces the *Rhizobium tropici* CIAT 899 Nod factor production via NodD2 by upregulation of the *nodA2* operon and the *nodA3* gene. *PLoS One* 14:e0213298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213298>.
- del Cerro P, Ayala-García P, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Vinardell JM, Megías M, Hungria M, Gil-Serrano AM, Pérez-Montaño F, Ollero FJ. 2019. The non-flavonoid inducible *nodA3* and the flavonoid regulated *nodA1* genes of *Rhizobium tropici* CIAT 899 guarantee nod factor production and nodulation of different host legumes. *Plant Soil* 440:185–200. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04073-2>.
- Lobell RB, Schleif RF. 1990. DNA looping and unlooping by AraC protein. *Science* 250:528–532. <https://doi.org/10.1126/science.2237403>.
- Gallegos MT, Schleif R, Bairoch A, Hofmann K, Ramos JL. 1997. AraC/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:393–410. <https://doi.org/10.1128/61.4.393-410.1997>.
- Bustos SA, Schleif RF. 1993. Functional domains of the AraC protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:5638–5642. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5638>.
- Saviola B, Seabold RR, Schleif RF. 1998. DNA bending by AraC: a negative mutant. *J Bacteriol* 180:4227–4232. <https://doi.org/10.1128/JB.180.16.4227-4232.1998>.
- Casadaban MJ. 1976. Regulation of the regulatory gene for the arabinose pathway, *araC*. *J Mol Biol* 104:557–566. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90120-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(76)90120-0).
- Hendrickson W, Schleif RF. 1984. Regulation of the *Escherichia coli* L-arabinose operon studied by gel electrophoresis DNA binding assay. *J Mol Biol* 178:611–628. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(84\)90241-9](https://doi.org/10.1016/0022-2836(84)90241-9).
- Seabold RR, Schleif RF. 1998. Apo-AraC actively seeks to loop. *J Mol Biol* 278:529–538. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1998.1713>.
- Lis JT, Schleif R. 1975. The regulatory region of the L-arabinose operon: its isolation on a 1,000-base-pair fragment from DNA heteroduplexes. *J Mol Biol* 95:409–416. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90199-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90199-0).
- Schleif R. 2010. AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiol Rev* 34:779–796. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00226.x>.
- Yang J, Tauschek M, Robins-Browne RM. 2011. Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. *Trends Microbiol* 19:128–135. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.12.001>.
- Journé L, Cascales E. 2016. The type VI secretion system in *Escherichia coli* and related species. *EcoSal Plus* 7. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2015>.
- Mukaihara T, Tamura N, Murata Y, Iwabuchi M. 2004. Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* 54:863–875. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04328.x>.
- Lipscomb L, Schell MA. 2011. Elucidation of the regulon and *cis*-acting

- regulatory element of HrpB, the AraC-type regulator of a plant pathogen-like type III secretion system in *Burkholderia pseudomallei*. J Bacteriol 193:1991–2001. <https://doi.org/10.1128/JB.01379-10>.
37. Li Y, Hu Y, Francis MS, Chen S. 2015. RcsB positively regulates the *Yersinia* Ysc-Yop type III secretion system by activating expression of the master transcriptional regulator LcrF. Environ Microbiol 17:1219–1233. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12556>.
 38. Schäper S, Steinchen W, Krol E, Altegoer F, Skotnicka D, Søgaard-Andersen L, Bange G, Becker A. 2017. AraC-like transcriptional activator CuxR binds c-di-GMP by a PilZ-like mechanism to regulate extracellular polysaccharide production. Proc Natl Acad Sci U S A 114:E4822–E4831. <https://doi.org/10.1073/pnas.1702435114>.
 39. Bringham RM, Gage DJ. 2000. An AraC-like transcriptional activator is required for induction of genes needed for α -galactoside utilization in *Sinorhizobium meliloti*. FEMS Microbiol Lett 188:23–27. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09163.x>.
 40. Lynch D, O'Brien J, Welch T, Clarke P, Cuív PO, Crosa JH, O'Connell M. 2001. Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. J Bacteriol 183:2576–2585. <https://doi.org/10.1128/JB.183.8.2576-2585.2001>.
 41. Kitagawa W, Takami S, Miyauchi K, Masai E, Kamagata Y, Tiedje JM, Fukuda M. 2002. Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. J Bacteriol 184:509–518. <https://doi.org/10.1128/jb.184.2.509-518.2002>.
 42. Vlassak KM, De Wilde P, Snoeck C, Luyten E, Van Rhijn P, Vanderleyden J. 1998. The *Rhizobium* sp. BR816 *nodD3* gene is regulated by a transcriptional regulator of the AraC/XylS family. Mol Gen Genet 258: 558–561. <https://doi.org/10.1007/s004380050768>.
 43. del Cerro P, Rolla-Santos AA, Valderama-Fernández R, Gil-Serrano A, Bellogín RA, Gomes DF, Pérez-Montaño F, Megías M, Hungria M, Ollero FJ. 2016. NrcR, a new transcriptional regulator of *Rhizobium tropici* CIAT 899 involved in the legume root-nodule symbiosis. PLoS One 11: e0154029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154029>.
 44. Peck MC, Fisher RF, Bliss R, Long SR. 2013. Isolation and characterization of mutant *Sinorhizobium meliloti* NodD1 proteins with altered responses to luteolin. J Bacteriol 195:3714–3723. <https://doi.org/10.1128/JB.00309-13>.
 45. Karimova G, Pidoux J, Ullmann A, Ladant D. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. Proc Natl Acad Sci U S A 95:5752–5756. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5752>.
 46. Estévez J, Soria-Díaz ME, de Córdoba FF, Morón B, Manyani H, Gil A, Thomas-Oates J, van Brussel AA, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M. 2009. Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na⁺ stress. FEMS Microbiol Lett 293:220–231. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01540.x>.
 47. Hungria M, Johnston AWB, Phillips DA. 1992. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. Mol Plant Microbe Interact 5:199–203. <https://doi.org/10.1094/mpmi-5-199>.
 48. Nogales J, Campos R, BenAbdelkhalik H, Olivares J, Lluich C, Sanjuan J. 2002. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. Mol Plant Microbe Interact 15:225–232. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2002.15.3.225>.
 49. Guasch-Vidal B, Estévez J, Dardanelli MS, Soria-Díaz ME, de Córdoba FF, Balog C, Manyani H, Gil-Serrano A, Thomas-Oates J, Hensbergen PJ, Deelder AM, Megías M, van Brussel AA. 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. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0213-R>.
 50. Vriezen JA, De Bruijn FJ, Nüsslein K. 2007. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. Appl Environ Microbiol 73:3451–3459. <https://doi.org/10.1128/AEM.02991-06>.
 51. Fernández-Unión C, Hamouada TB, Iglesias-Guerra F, Argandoña M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, Aouani ME, Vargas C. 2010. Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. BMC Microbiol 10:192. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-192>.
 52. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 53. Beringer JE. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol 84:188–198. <https://doi.org/10.1099/00221287-84-1-188>.
 54. Spaink HP. 1992. Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. Plant Mol Biol 20:977–986. <https://doi.org/10.1007/BF00027167>.
 55. Vincent JM. 1970. The modified Fähræus slide technique, p 144–145. In Vincent JM (ed), A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications, Oxford, United Kingdom.
 56. Lamrabet Y, Bellogín RA, Cubo T, Espuny R, Gil A, Krishnan HB, Megías M, Ollero FJ, Pueppke SG, Ruiz-Sainz JE, Spaink HP, Tejero-Mateo P, Thomas-Oates J, Vinardell JM. 1999. Mutation in GDPfucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. Mol Plant Microbe Interact 12:207–217. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1999.12.3.207>.
 57. Griffiths JS, Long SR. 2008. A symbiotic mutant of *Sinorhizobium meliloti* reveals a novel genetic pathway involving succinoglycan biosynthetic functions. Mol Microbiol 67:1292–1306. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06123.x>.
 58. Spaink HP, Okker RJ, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJ. 1987. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. Plant Mol Biol 9:27–39. <https://doi.org/10.1007/BF00017984>.
 59. Kelly SJ, Muszyński A, Kawaharada Y, Hubber AM, Sullivan JT, Sandal N, Carlson RW, Stougaard J, Ronson CW. 2013. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. Mol Plant Microbe Interact 26:319–329. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0227-R>.
 60. Simon R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. Mol Gen Genet 196:413–420. <https://doi.org/10.1007/BF00436188>.
 61. López-Baena FJ, Monreal JA, Pérez-Montaño F, Guasch-Vidal B, Bellogín RA, Vinardell JM, Ollero FJ. 2009. The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases GmPR1 expression in Williams soybean. Mol Plant Microbe Interact 22:1445–1454. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-11-1445>.
 62. Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger data sets. Mol Biol Evol 33: 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
 63. Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Res 32:1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
 64. Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. Proc Natl Acad Sci U S A 101:11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>.
 65. de Maagd RA, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg B. 1988. Detection and subcellular localization of two Sym plasmid-dependent proteins of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. J Bacteriol 170:4424–4427. <https://doi.org/10.1128/jb.170.9.4424-4427.1988>.
 66. Zaat SA, Wijffelman CA, Spaink HP, van Brussel AA, Okker RJ, Lugtenberg BJ. 1987. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1 by plant flavanones and flavones. J Bacteriol 169: 198–204. <https://doi.org/10.1128/jb.169.1.198-204.1987>.
 67. Miller JH. 1972. Experiment in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 68. Spaink HP, Aarts A, Stacey G, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ, Kennedy EP. 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. Mol Plant Microbe Interact 5:72–80. <https://doi.org/10.1094/mpmi-5-072>.
 69. Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nat Biotechnol 28:511–515. <https://doi.org/10.1038/nbt.1621>.
 70. Anders S, Huber W. 2010. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol 11:R106. <https://doi.org/10.1186/gb-2010-11-10-r106>.
 71. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. 2010. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. Bioinformatics 26:139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
 72. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res 37:1–13. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn923>.
 73. Rice J. 2007. Mathematical statistics and data analysis, 3rd ed, p 42. Duxbury Press, Pacific Grove, CA.
 74. Pfaffl MW. 2001. New mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>.
 75. Pei J, Kim BH, Grishin NV. 2008. PROMALS3D: a tool for multiple protein

- sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Res* 36:2295–2300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn072>.
76. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview version 2: a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25:1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.
 77. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction, and analysis. *Nat Protoc* 10:845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
 78. Lowden MJ, Skorupski K, Pellegrini M, Chiorazzo MG, Taylor RK, Kull FJ. 2010. Structure of *Vibrio cholerae* ToxT reveals a mechanism for fatty acid regulation of virulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:2860–2865. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915021107>.
 79. Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, Ferrin TE. 2018. UCSF ChimeraX: meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci* 27:14–25. <https://doi.org/10.1002/pro.3235>.
 80. Kawaharada Y, Nielsen MW, Kelly S, James EK, Andersen KR, Rasmussen SR, Füchtbauer W, Madsen LH, Heckmann AB, Radutoiu S, Stougaard J. 2017. Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia. *Nat Commun* 8:14534. <https://doi.org/10.1038/ncomms14534>.
 81. Dardanelli MS, Fernández de Cordoba FJ, Espuny MR, Rodríguez-Carvajal MÁ, Soria-Díaz ME, Gil-Serrano AM, Okon Y, Megías M. 2008. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biol Biochem* 40:2713–2721. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.06.016>.
 82. Figurski DH, Helinski DR. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:1648–1652. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.4.1648>.
 83. Schäfer A, Tauch A, Jäger 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. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7).

Figuras suplementarias capítulo 1

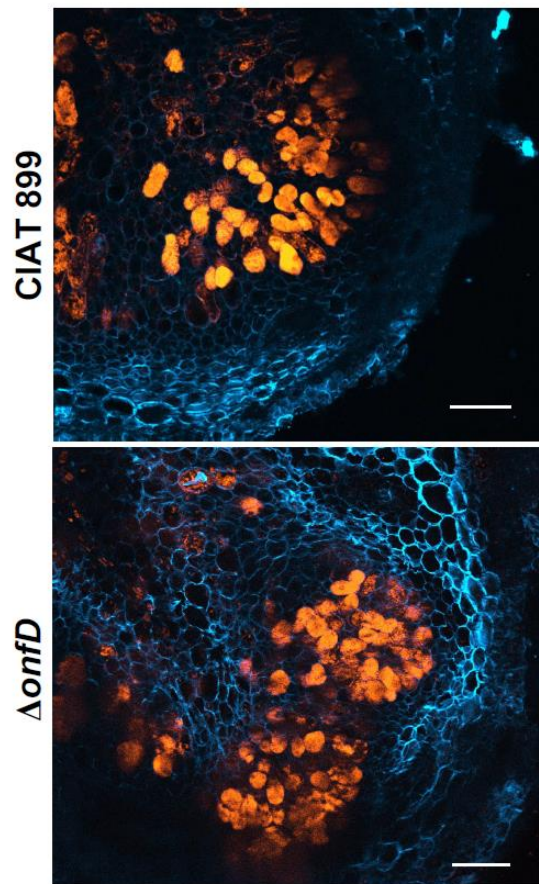


Fig S1. Nodule occupancy of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and the *onfD* mutant in *P. vulgaris*. Light microscopy images of nodules of *P. vulgaris* were captured from plants inoculated with the abovementioned strains carrying the DsRed reporter gene. Bars correspond to 100 μ m. Images were captured at 30 dpi.

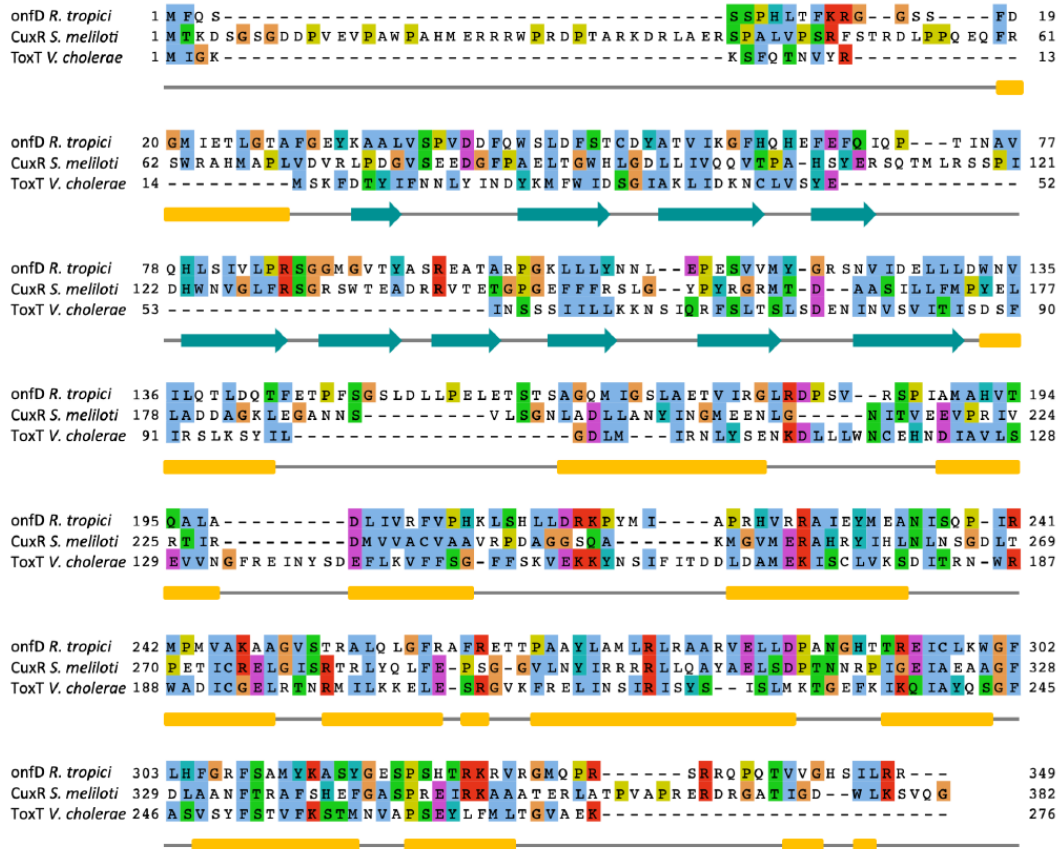


Fig. S2. Sequence alignment of OnfD, CuxR and ToxT. The consensus secondary structure motifs (α -helices as yellow tubes, β -strands as cyan arrows) are shown underneath the alignment. The protein sequence and structure alignments were performed with PROMALS3D and displayed with the program Jalview using the ClustalX coloring scheme.

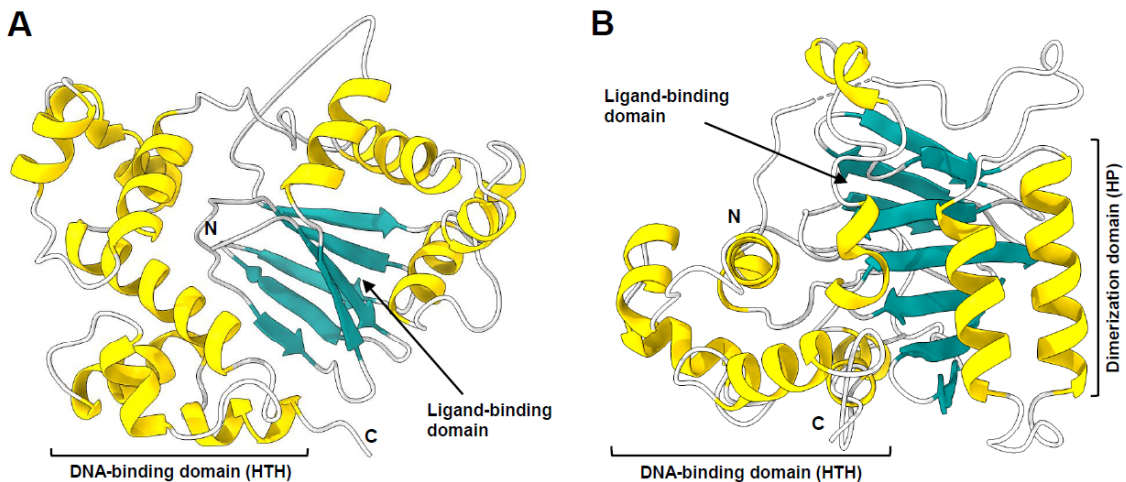


Fig S3. Structural models of OnfD based on the crystal structures of *V. cholerae* ToxT (3GBG, **A**) and *S. meliloti* CuxR (5NLA, **B**). Ribbon diagrams of the OnfD protein models show α -helices (yellow), β -strands (cyan), and loops (grey). The N and C termini (N and C, respectively) are labelled. HTH = Helix-turn-helix, HP = Helical hairpin.

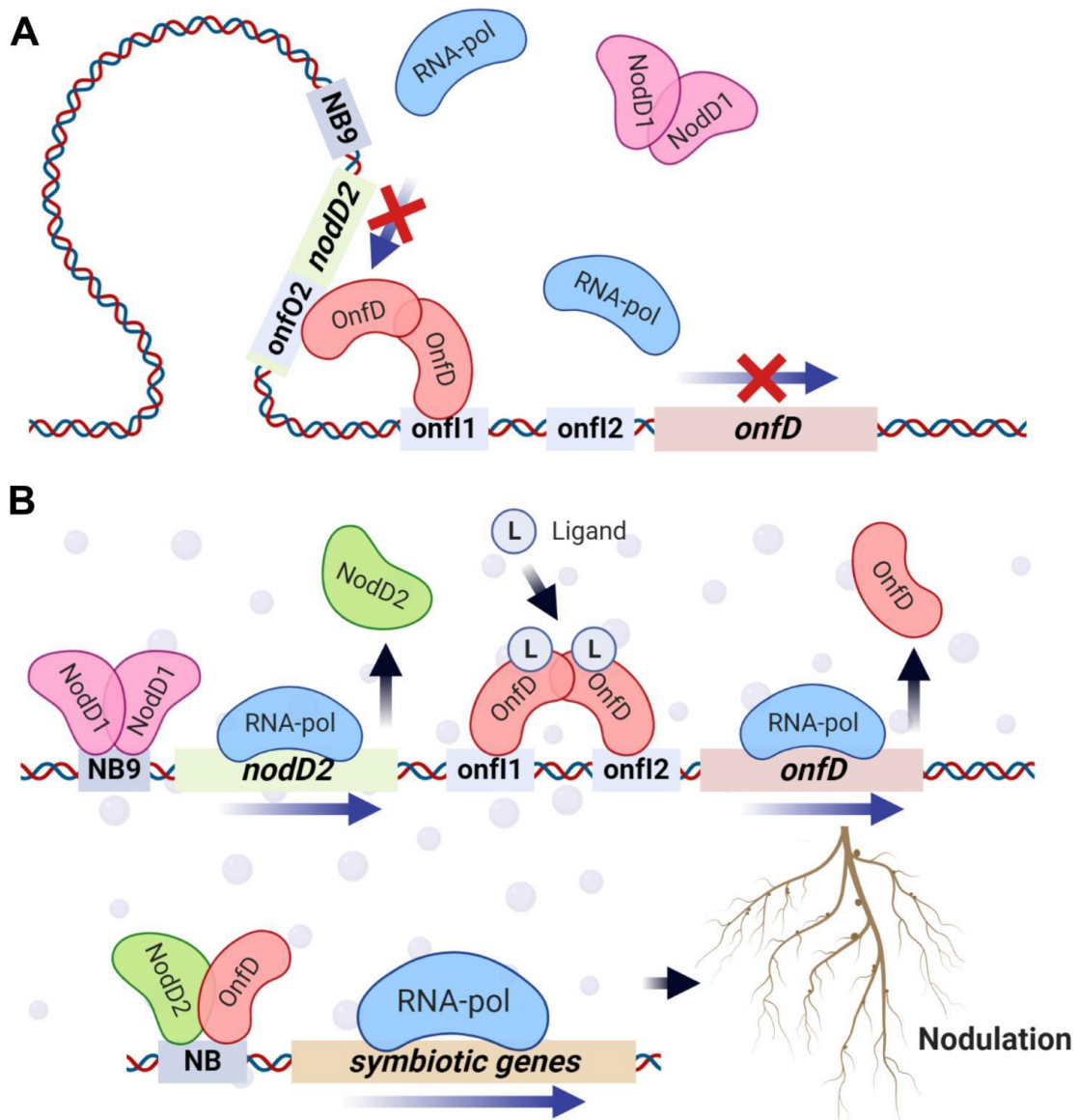


Fig. S4. Model of regulation of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 *nodD2* and *onfD* genes in the presence or absence of salt. **A.** In the absence of salt, each monomer of the OnfD dimer would occupy the *onf11* and *onfO2* site, leading to the formation of a DNA loop that would be blocking the up-regulation of the *nodD2* and *onfD* gene. **B.** Under salt stressing conditions, one of the intracellular compatible solutes (Ligand, L) would bind to the dimeric OnfD, generating a conformational change that would lead the occupancy of the inducer sites *onf11* and *onf12*. Recruitment of the RNA polymerase by the dimeric and activated OnfD would be facilitated for the basal transcription of the *nodD2* gene mediated by NodD1. As a consequence, OnfD and NodD2 cytoplasmatic amounts increase, allowing the formation of OnfD-NodD2 heterodimers, which would interact to all NB activated in the presence of salt (NB1-5) promoting the transcriptional activation of the CIAT 899 symbiotic genes. Figure created with BioRender.com.

Table S1. NF synthesized in the absence and in the presence of apigenin (3.7 μ M) or salt (300 mM) by the *onfD* mutant.

NF structure ^a	CIAT 899 + apigenin and salt ^b	$\Delta onfD^b$	$\Delta onfD$ + salt ^b	$\Delta onfD$ + apigenin ^b
III (C _{16:0})	-	-	-	+
III (C _{16:0} , NMe)	-	-	-	+
III (C _{18:0})	-	-	-	+
III (C _{18:1})	-	-	-	+
IV (C _{14:0})	-	-	-	+
IV (C _{14:0} , NMe)	-	-	-	+
IV (C _{16:0})	+	-	-	+
IV (C _{16:0} , NMe)	-	-	-	+
IV (C _{16:1})	+	-	-	+
IV (C _{18:0})	+	-	-	+
IV (C _{18:0} , NMe)	+	-	-	+
IV (C _{18:1})	+	-	+	+
IV (C _{18:1})dNAc	-	-	-	+
IV (C _{18:1} , NMe)	+	-	-	+
IV (C _{18:1} , NMe, S)	-	-	-	+
IV (C _{18:1} , S)	-	-	-	+
IV (C _{20:0})	+	-	-	-
V (C _{14:0})	+	-	-	+
V (C _{14:0} , NMe)	+	-	-	+
V (C _{16:0}) dNAc	+	-	-	-
V (C _{16:0} , NMe)	-	-	-	+
V (C _{16:0} , NMe)	+	-	-	-
V (C _{16:0} , NMe, S)	+	-	-	-
V (C _{16:1} , NMe)	+	-	-	+
V (C _{18:0})	+	-	+	+
V (C _{18:0} , NMe)	+	-	-	+
V (C _{18:0} , NMe, S)	+	-	-	+
V (C _{18:0} , S)	+	-	-	-
V (C _{18:1})	+	+	+	+
V (C _{18:1}) dNAc	-	-	-	+
V (C _{18:1} , NMe)	-	-	-	+
V (C _{18:1} , NMe) dNAc	-	-	-	+
V (C _{18:1} , NMe, S)	+	-	-	+
V (C _{18:1} , S)	+	-	+	+
V (C _{20:0})	+	-	-	-
V (C _{20:0} , NMe)	+	-	-	-
V (C _{20:0} , NMe, S)	+	-	-	-
V (C _{20:1} , NMe, S)	+	-	-	-
V (C _{20:1} , NMe)	+	-	-	-
Number of LCO synthesized	25	1	4	29

^a NF structure are represented following the convention (Spaink HP, Okker RJ, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJ. 1989. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. Plant Mol Biol 9:27-39) that indicates the number of GlcNAc residues in the backbone (Roman numeral), the length and degree of unsaturated of the fatty acyl chain, and the other substituents, which are listed in the order in which they appear, moving clockwise from the fatty acid. NMe, N-methyl group at the glucosamine non-reducing residue; S, sulfate at reducing glucosamine residue; dNAc in 3 or 4, deacetylated at glucosamine residues number 3 or 4; OH, hydroxylated fatty acid. ^bSymbol: +, detected; -, non-detected.

CAPÍTULO 2.

The *Rhizobium tropici* CIAT 899
NodD2 protein promotes symbiosis and
extends rhizobial nodulation range by
constitutive nodulation factor synthesis.

RESEARCH PAPER

The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein promotes symbiosis and extends rhizobial nodulation range by constitutive nodulation factor synthesis

Paula Ayala-García¹, Irene Jiménez-Guerrero¹, Catherine N. Jacott², Francisco Javier López-Baena¹, Francisco Javier Ollero¹, Pablo del Cerro^{1,†,*} and Francisco Pérez-Montaño^{1,*,}

¹ Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

² Department of Crop Genetics, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, UK

[†] Present address: Department of Cell and Developmental Biology, John Innes Centre, Norwich Research Park, Norwich, UK.

* Correspondence: pdelcerro@us.es, pablo.del-cerro-sanchez@jic.ac.uk, or fperez@us.es

Received 13 April 2022; Editorial decision 22 July 2022; Accepted 24 July 2022

Editor: Eloise Foo, University of Tasmania, Australia

Abstract

In the symbiotic associations between rhizobia and legumes, the NodD regulators orchestrate the transcription of the specific nodulation genes. This set of genes is involved in the synthesis of nodulation factors, which are responsible for initiating the nodulation process. *Rhizobium tropici* CIAT 899 is the most successful symbiont of *Phaseolus vulgaris* and can nodulate a variety of legumes. Among the five NodD regulators present in this rhizobium, only NodD1 and NodD2 seem to have a role in the symbiotic process. However, the individual role of each NodD in the absence of the other proteins has remained elusive. In this work, we show that the CIAT 899 NodD2 does not require activation by inducers to promote the synthesis of nodulation factors. A CIAT 899 strain overexpressing *nodD2*, but lacking all additional *nodD* genes, can nodulate three different legumes as efficiently as the wild type. Interestingly, CIAT 899 NodD2-mediated gain of nodulation can be extended to another rhizobial species, since its overproduction in *Sinorhizobium fredii* HH103 not only increases the number of nitrogen-fixing nodules in two host legumes but also results in nodule development in incompatible legumes. These findings potentially open exciting opportunities to develop rhizobial inoculants and increase legume crop production.

Keywords: Common bean, infection thread, nodulation, nodulation factor, *Lotus*, rhizobium–legume symbiosis, *Rhizobium tropici*.

Introduction

Nitrogen is an important macronutrient essential for all aspects of plant growth and crop productivity (White and Brown, 2010). Paradoxically, nitrogen has poor availability in soils leading to extensive fertilizer synthesis and application onto

agricultural soils: both are highly energy-demanding processes that contribute to climate change and soil pollution (Tilman *et al.*, 2002; Woods *et al.*, 2010; Iyngaran *et al.*, 2011). Legume plants can establish a symbiotic interaction with certain soil

proteobacteria—known as rhizobia—that convert atmospheric nitrogen to ammonia inside specialized root organs called nodules, thereby increasing nitrogen availability to the host plant and improving plant performance (Oldroyd, 2013). Thus, the application of nitrogen-fixing bacteria to legume crops presents an opportunity for sustainable agriculture.

Establishing the legume–rhizobium symbiotic interaction requires a complex and evolved molecular exchange of signals between both organisms. Compatible flavonoids exuded from legume roots into the rhizosphere are recognized by rhizobial NodD transcriptional regulators (Cooper, 2007; Hassan and Mathesius, 2012). The flavonoid-activated NodD protein then binds to conserved promoter regions upstream of nodulation (*nod*) genes, activating their expression (Schlaman *et al.*, 1998; Peck *et al.*, 2006; Long, 2016). The Nod proteins encoded by these genes are involved in the synthesis and export of lipochitooligosaccharides, also known as Nod factors (NF). In exchange, NFs are perceived by specific plant LysM-receptors that trigger a downstream signalling cascade leading to rhizobium-specific intracellular colonization of the root hair via infection thread formation and eventual development of nodules on roots (Dénarié *et al.*, 1996; Radutoiu *et al.*, 2003). An ancient and less sophisticated mechanism of rhizobial intercellular root infection via cracks at emergent lateral roots or between epidermal cells is also widespread in the legume family (Sprent *et al.*, 2007; Montiel *et al.*, 2021).

Recent studies suggest that NodD proteins may have additional roles beyond post-initial recognition and that flavonoid-independent inducers may activate NodD. For example, *Mesorhizobium loti* R7A NodD2 is active in the nodules, unlike NodD1 which is active during the root-hair colonization at the infection thread (Kelly *et al.*, 2018). Interestingly, *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* strains that harbour a second NodD copy exhibit enhanced nodule colonization and competitiveness (Ferguson *et al.*, 2020). In both *M. loti* and *R. leguminosarum* sv. *trifolii*, protein structural comparisons between these additional NodD regulators and the flavonoid–NodD1 demonstrate low conservation in the predicted flavonoid binding sites. These data suggest that an alternative molecule could act as a NodD protein inducer, particularly since these specific NodD proteins are active when rhizobia are inside the roots or nodules compared with the rhizosphere.

The ability to recognize different flavonoids is the primary rhizobial determinant of host range (Walker *et al.*, 2020). Therefore, the presence of more than one *nodD* in the genome is generally associated with a broader host-range ability. *Rhizobium tropici* CIAT 899 (hereafter CIAT 899) is a broad host range rhizobial strain that nodulates some legumes, including *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, and *Lotus burtii* (Martínez-Romero *et al.*, 1991; del Cerro *et al.*, 2015a, b). Genome sequencing of CIAT 899 revealed five different *nodD* genes located in the symbiotic plasmid (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012). Interestingly, the CIAT 899 *nodD2* gene is up-regulated and active in the presence of osmotic stress, resulting in the

activation of *nod* gene expression even in the absence of flavonoids, raising hypotheses that an osmotic stress-dependent molecule could act as a NodD2 inducer or that the increase in *nodD2* expression alone could be responsible for NF production (Pérez-Montañó *et al.*, 2016; del Cerro *et al.*, 2017, 2019). A *nodD2* mutant exhibited detrimental effects on the symbiotic performance in its natural host, *Phaseolus vulgaris*, but symbiotic ability in the other host plants, *Lotus japonicus* and *Lotus burtii*, was unaffected (del Cerro *et al.*, 2017), which could be due to genetic *nodD* redundancy. Among additional NodD proteins, NodD1 is active in the presence of compatible flavonoids and its absence abolishes nodulation in *L. japonicus* and reduces nodulation in *P. vulgaris* and *L. burtii* (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012; del Cerro *et al.*, 2015a, b). However, a double mutant in *nodD1* and *nodD2* genes abolishes nodulation in all three plant species confirming the relevance of the flavonoid-activated NodD1 and osmotic stress-activated NodD2 proteins during symbiosis.

Here, we demonstrate that NodD2 does not require activation by inducers such as compatible flavonoids or an osmotic stress-dependent molecule. We show that overexpression of *nodD2* alone results in a strong induction of *nod* genes in any tested condition. Furthermore, we demonstrate that a strain overexpressing *nodD2*—but lacking all additional *nodD* genes including *nodD1*—can nodulate *P. vulgaris*, *L. japonicus* and *L. burtii* as efficiently as the wild-type (WT) strain. Finally, we show that the overexpression of *nodD2* in *Sinorhizobium fredii* HH103 results in nodule development in the incompatible non-host *P. vulgaris* and increased the number of nitrogen-fixing nodules in hosts such as *L. japonicus* and *L. burtii*. The finding that overexpression of *nodD2* alone can increase host range and symbiotic efficiency in several legume plants could lead to exciting opportunities for developing novel rhizobial inoculants to increase crop production.

Material and methods

Bacterial growth conditions, plasmids, and obtaining mutant

All strains and plasmids used in this work are listed in Supplementary Table S1. *Escherichia coli* strains were cultured on LB medium (Sambrook *et al.*, 1989) at 37 °C. *Rhizobium tropici* CIAT 899 strains were grown at 28 °C on tryptone yeast (TY) medium (Beringer, 1974), B⁻ minimal medium (Spaink *et al.*, 1992), or modified yeast extract mannitol (YM3, with 3 g ml⁻¹ of mannitol) medium (Vincent, 1970), supplemented, when necessary, with 3.7 μM apigenin, 300 mM NaCl, or 400 mM mannitol.

The quintuple $\Delta nodD1-5$ deletion mutant was generated using five rounds of overlapping PCR extensions: the double $\Delta nodD1/\Delta nodD2$ mutant (del Cerro *et al.*, 2017) was used as a recipient to generate $\Delta nodD123$, which was subsequently used to obtain a quadruple mutant, the base for the construction of the quintuple $\Delta nodD12345$ mutant. In total, 919, 328, 756, 930 and 930 bp lengths were deleted from *nodD1* (RTCIAT899_PB01295), *nodD2* (RTCIAT899_PB01070), *nodD3* (RTCIAT899_PB00640), *nodD4* (RTCIAT899_PB01560), and *nodD5* (RTCIAT899_PB00560), respectively. The deleted *nodD3-5* genes were first subcloned into the pK18mobsacB vector generating the pK18mobsacB:: $\Delta nodD3$, pK18mobsacB:: $\Delta nodD4$, and

pK18*mobsacB*:: Δ *nodD5* vectors. Then, plasmids were transferred by conjugation and integrated into the genome of the corresponding strain by single recombination. A double homologous recombination event, in which the WT copy of the gene together with plasmid pK18*mobsacB* were lost, was selected for each *nodD* gene. Mutated strains were confirmed by PCR and DNA–DNA hybridization. For this, DNA was blotted to Hybond-N nylon membranes (Sigma), and the DigDNA method of Roche (Basel, Switzerland) was employed according to the manufacturer's instructions. The *in cis* complementation of the different *nodD* genes (LE *nodD* strains) was performed by integration of the different pK18*mobsacB*::*nodD* plasmids into the genome of the Δ *nodD1–5* mutant, obtaining derivative strains that harbour both WT and deleted versions of the corresponding *nodD* gene. Complementation *in trans* (OE *nodD* strains) *nodD* versions was carried out by cloning full open reading frame and own promoter sequences into the multicopy vector pBBR-1-MCS-5. The resulting plasmids were individually introduced in Δ *nodD1–5* by conjugation, obtaining derivative strains that constitutively overexpress single *nodD* genes. Complemented strains were confirmed by PCR. Plasmid pMP220::P_{nodA1}, obtained as in [del Cerro et al. \(2020\)](#), bearing the promoter region of the *nodA1* gene upstream of the *lacZ* reporter gene was conjugated into the different CIAT 899 WT and derivative strains. Plasmid pFAJDsRed, which harbours a gene for red fluorescence, was also introduced by conjugation in CIAT 899 and derivatives ([Kelly et al., 2013](#)). All plasmids were transferred from *Escherichia coli* to CIAT 899 by conjugation as previously described using plasmid pRK2013 as the helper ([Simon, 1984](#)). Recombinant DNA techniques were performed according to the general protocols of [Sambrook et al. \(1989\)](#). Primers used in this study are listed in [Supplementary Table S2](#).

RNA extraction, cDNA synthesis, and quantitative RT-PCR

RNA extraction, cDNA synthesis and quantitative RT-PCR (qPCR) experiments were performed as previously described ([Pérez-Montañó et al., 2016](#)). Briefly, total RNA was isolated from bacterial cultures grown in TY medium using a High Pure RNA Isolation Kit (Roche) and RNAase Free DNA Set (Qiagen, USA), according to the manufacturer's instructions. Verification of the amount and quality of RNA samples was carried out using a Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) and a Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). Two independent total RNA extractions were obtained for each condition.

This (DNA-free) RNA was reverse transcribed into cDNA using PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Takara, Japan). Quantitative PCR was performed using a LightCycler 480 (Roche) with the following conditions: 95 °C, 10 min; 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 20 s; 40 cycles, followed by the melting curve profile from 60 to 95 °C to verify the specificity of the reaction. The *R. tropici* CIAT 899 16S rRNA gene was used as an internal control to normalize gene expression. The fold-changes of two biological samples with three technical replicates of each condition were obtained using the $\Delta\Delta C_t$ method ([Pfaffl, 2001](#)). Selected genes and primers are listed in [Supplementary Table S2](#).

Determination of β -galactosidase activity

To determine β -galactosidase activity, complemented strains were conjugated with the plasmid pMP220::P_{nodA1} ([del Cerro et al., 2020](#)) containing a transcriptional fusion between the CIAT 899 *nodA1* promoter and the *lacZ* gene. Assays of β -galactosidase activity were carried out as described by [Zaat et al. \(1987\)](#) from bacterial cultures grown in YM3 medium. Units of β -galactosidase activity were calculated according to [Miller \(1972\)](#). The experiments were repeated three times.

Identification of NF

Chemical identification of the NF was carried out with an ultra-high-pressure liquid chromatography system coupled to a mass spectrometer (UHPLC-MS/MS) as previously described by [Jiménez-Guerrero et al. \(2020a\)](#), growing the WT and the derivative mutant strains in B⁻ minimal medium. The NF detected that presented lower area values than 10⁷ in the UHPLC-MS/MS analyses were discarded.

Protein alignment and secondary structure modelling

The protein sequence alignment of the five NodD proteins was performed with PROMALS3D ([Pei et al., 2008](#)) and displayed with Jalview software using the homology colouring scheme ([Waterhouse et al., 2009](#)). A percentage identity matrix was created by Clustal 2.1. Models for the secondary structure of NodD1 and NodD2 were made with Phyre2 ([Kelly et al., 2015](#)), a web server for protein modelling that uses homology detection methods to build three-dimensional models of proteins, using as a reference the predicted structure of NodD1 from *Sinorhizobium meliloti* ([Peck et al., 2013](#)).

Nodulation assays

For the evaluation of the symbiotic phenotypes, the different CIAT 899 strains were grown in YM3 medium until the bacterial concentration reached about 10⁹ cells ml⁻¹. Surface-sterilized seeds of *P. vulgaris*, *L. burtii*, and *L. japonicus* were pre-germinated and placed on sterilized jars (for *P. vulgaris*, Leonard jars) containing vermiculite and perlite substrates (3:1) and Farhaeus N-free solution as previously described ([del Cerro et al., 2015a, b](#)). Each pre-germinated and sterilized seed was inoculated with 1 ml of bacterial culture. Growth conditions were 16 h at 26 °C in the light and 8 h and 18 °C in the dark, with 70% of humidity. Nodulation parameters were evaluated after 30 d for *P. vulgaris* or 50 d for *Lotus* plants. Nodulation experiments were performed two times.

Microscopy

Lotus burtii and *L. japonicus* plants were grown on ¼ B&D medium ([Kelly et al., 2018](#)) in 12 cm square plates at 21 °C with 16 h–8 h day–night cycles. For observing nodules, 21-day-old *Lotus* nodules induced by the different strains carrying the DsRed fluorescent marker were embedded in 6% agarose in water and sliced in thick layer sections (30–50 μ m) using a Leica VT 1000S vibratome. Sections of nodules were stained with 0.04% calcofluor ([Kawaharada et al., 2017](#)) and observed using a Zeiss LSM510 META confocal microscope. For observing infection threads (ITs), *L. burtii* and *L. japonicus* seedlings grown in square plastic dishes were inoculated with the different strains carrying the DsRed fluorescent marker, 7 d after germination. ITs were observed by Zeiss Axioplan 2 imaging using an Olympus BX53 microscope (Olympus, Japan). Image pictures were merged by using CellSens standard software (Olympus).

Results

NodD2 strongly induces the expression of the R. tropici CIAT 899 nod genes and NF synthesis in the absence of inducers

Rhizobium tropici CIAT 899 has five NodD proteins. NodD1 and NodD2 are the main *nod*-gene regulators since a double *nodD1/nodD2* mutant abolishes NF production and impairs nodule formation in *P. vulgaris* and *L. burtii* ([del Cerro et al., 2017](#)). It is unknown whether each NodD protein can function

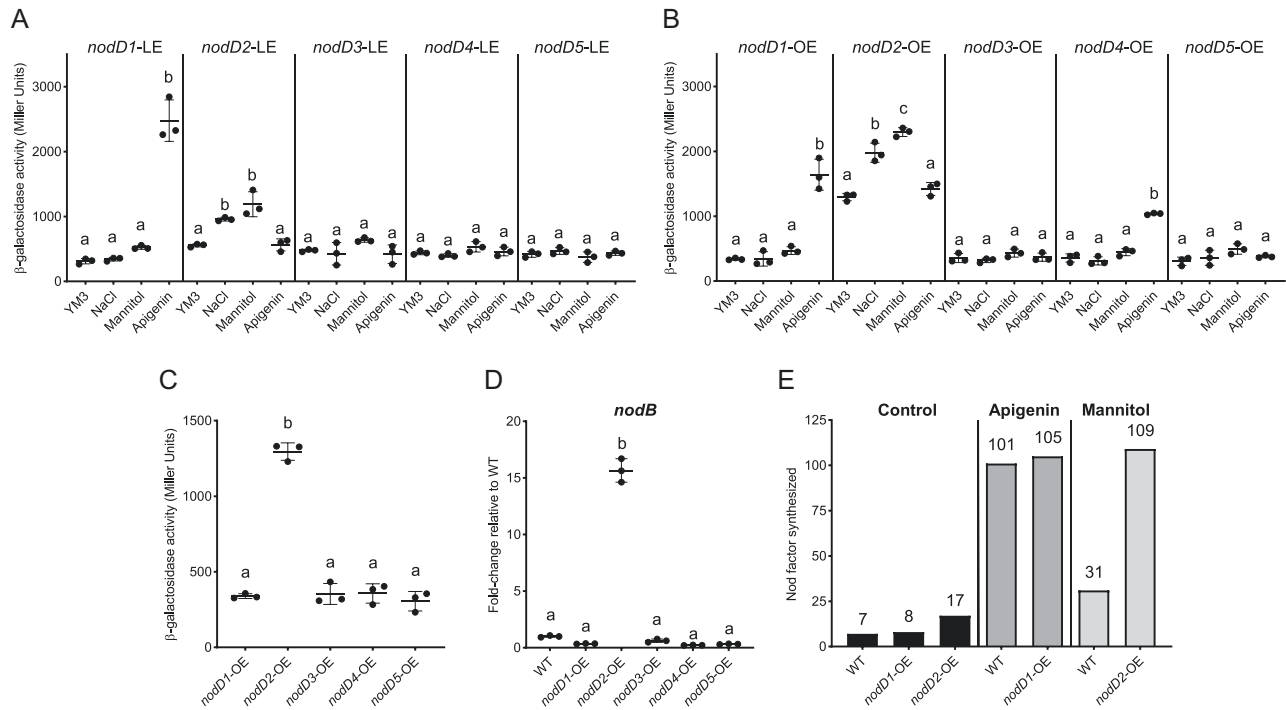


Fig. 1. *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 induces the expression of *nod* genes in the absence of inducers. *Rhizobium tropici* CIAT 899 quintuple *nodD* mutant strains carrying CIAT 899 *nodA1* promoter fused to the *lacZ* gene and expressing *nodD* genes individually at low (LE), or high (overexpression) (OE) levels. (A, B) β -Galactosidase activity of the LE (A) and OE (B) strains during different treatments: control (YM3), flavonoid treatment (YM3 + 3.7 μ M flavonoid apigenin), and osmotic stress treatments (YM3 + 300 mM NaCl, or YM3 + 400 mM mannitol). (C) β -Galactosidase activity of the OE strains during control (YM3) treatment. (D) Gene expression of *R. tropici* CIAT 899 *nodB* during control (YM3) treatment in WT and *nodD*-OE strains. Expression levels were measured by qRT-PCR, normalized to 16S rRNA gene, and plotted relative to WT. (E) Number of NFs produced by WT, *nodD1*-OE, and *nodD2*-OE in the presence and the absence of inducers measured by UHPLC-MS/MS. Plots (C, D) represent the means (lines), standard deviation (error bars), and individual biological replicates (dots). In (A–D) a one-way ANOVA was used to test for differences between mutants with a Tukey correction for multiple comparisons (same letters represent no significant difference at 0.05% level).

with those inoculated with the WT strain due to the lack of rhizobial nitrogen fixation events. In *P. vulgaris* and *L. burtitii*, the SDW of the plants inoculated with *nodD2*-LE, *nodD1*-OE, or *nodD2*-OE was similar to those inoculated with the WT strain, whereas the plants inoculated with *nodD1*-LE showed lower SDW in *L. burtitii*. In *L. japonicus*, none of the plants inoculated with the LE and OE reached the SDW levels of the WT. Only the plants inoculated with *nodD1*-OE and *nodD2*-OE strains presented higher SDW than the Δ *nodD1–5* mutant. The three legumes inoculated with the additional *nodD*-LE or *nodD*-OE strains showed similar SDW to the plants inoculated with the Δ *nodD1–5* mutant. In summary, these results suggest that in the absence of other NodD proteins (including NodD1), a low expression of *nodD2* alone (*nodD2*-LE) is sufficient for forming nitrogen-fixing nodules in *P. vulgaris* and *L. burtitii*. Indeed, in all three plant species, overexpression of *nodD2* alone is sufficient to completely restore nodulation to WT levels.

CIAT 899 mainly infects L. burtitii plants intercellularly but the overexpression of nodD2 enhances infection thread formation

CIAT 899 colonizes its natural host (*P. vulgaris*) via the formation of infection threads (IT) in root hairs, in a process

dependent on NF (Rodríguez-López *et al.*, 2019). In *L. burtitii* and *L. japonicus*, both NodD1 and NodD2 are involved in nodulation (Fig. 2B, C). However, to this date, the infection mechanism in *Lotus* by CIAT 899 (IT formation versus intercellular entry) and the role of the NodD proteins in the infection process remain unknown.

To establish how CIAT 899 colonizes *L. burtitii* and *L. japonicus*, we examined IT formation and nodule occupancy in both plants inoculated with CIAT 899. We observed low numbers of ITs in only 5/20 plants (25%) but fully colonized root and nodules in all plants (20/20), which points to the fact that CIAT 899 mainly colonizes *L. burtitii* intercellularly (Fig. 2D; Supplementary Fig. S4). In the case of *L. japonicus*, no ITs were observed in any plant inoculated with CIAT 899 but fully colonized roots and nodules were observed in all analysed plants (50/50), indicating that CIAT 899 colonizes *L. japonicus* intercellularly (Fig. 2E). To investigate the individual contribution of NodD1 and NodD2 to the low incidences of IT formation in *L. burtitii*, we examined the presence of ITs in plants inoculated with two single deletion mutants (Δ *nodD1* and Δ *nodD2*) obtained in a previous study (del Cerro *et al.*, 2017). We observed no ITs in plants inoculated with the Δ *nodD1* mutant; however, fully colonized roots

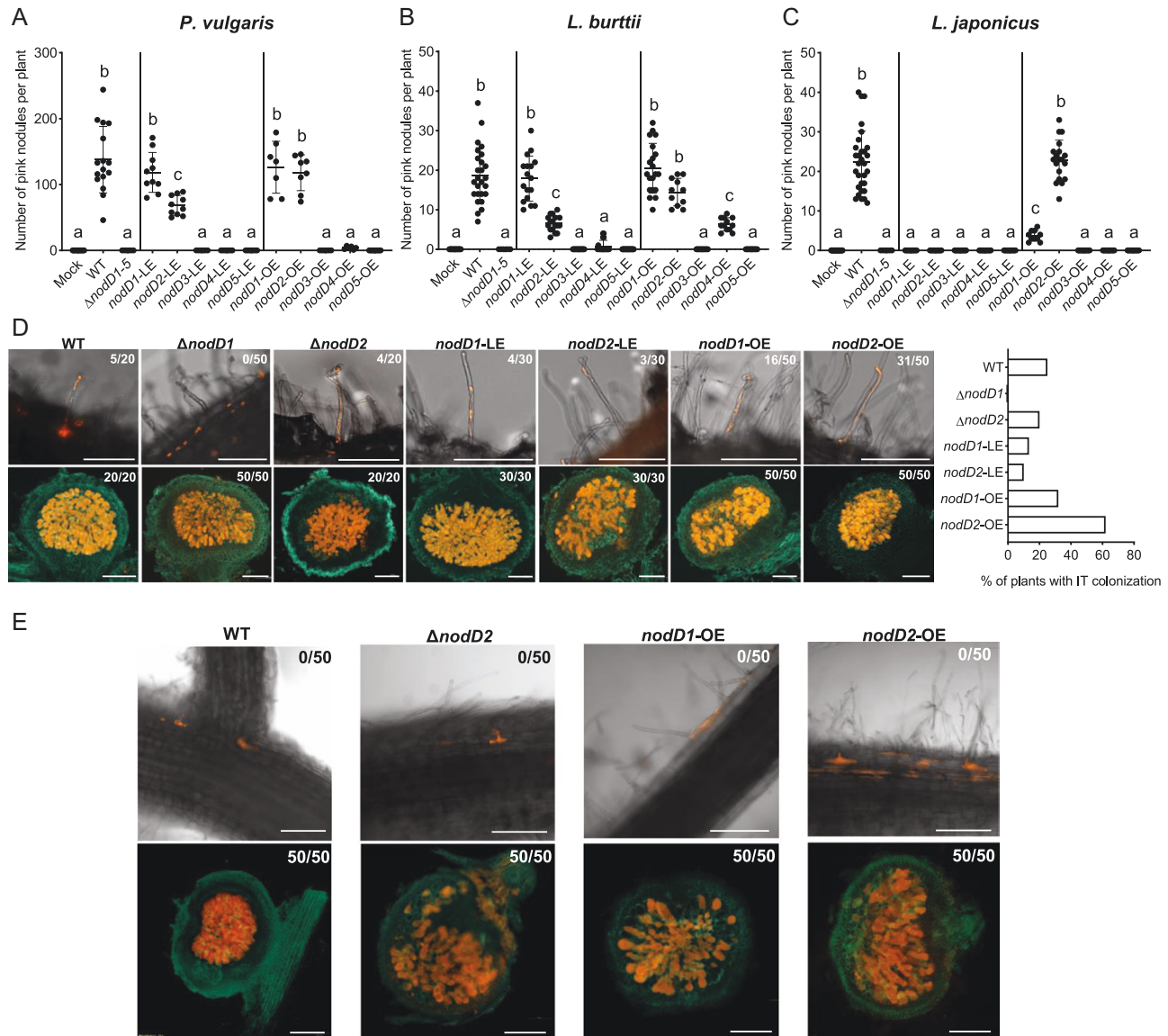


Fig. 2. Overexpression of *Rhizobium tropici* CIAT 899 *nodD2* in a quintuple *nodD* mutant restores nodulation in *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, and *Lotus burtii*, and enhances the incidence of infection thread formation in *L. burtii*. (A–C) Number of pink (nitrogen-fixing nodules) in *P. vulgaris* (A), *L. burtii* (B), and *L. japonicus* (C) plants quantified 30 (A) or 50 (B, C) days post-inoculation with *R. tropici* CIAT 899; quintuple *nodD* mutant ($\Delta nodD1-5$); and *nodD* quintuple mutant strains expressing *nodD* genes individually at low levels (LE), or high (overexpression) levels (OE). Plots represent the means (lines), standard deviation (error bars), and individual biological replicates (dots). A one-way ANOVA was used to test for differences between mutants with a Tukey correction for multiple comparisons (same letters represent no significant difference at 0.05% level). (D) Infection threads (top panel) and fully colonized nodules (lower panel) of *L. burtii* plants inoculated with *R. tropici* CIAT 899 WT, single deletion mutants $\Delta nodD1$ and $\Delta nodD2$, and quintuple deletion mutant strains expressing *nodD1* or *nodD2* (*nodD1*-LE, *nodD2*-LE, *nodD1*-OE, and *nodD2*-OE) harbouring *DsRed* fluorescent marker. The number of plants with infection threads or nodules is indicated on the top right-hand side of each image. Scale bar: 200 μ m. (E) Intercellular entry (top panel) and fully colonized nodules (lower panel) of *L. japonicus* plants inoculated with *R. tropici* CIAT 899, single deletion mutant $\Delta nodD2$, and quintuple deletion mutant strains over-expressing *nodD1* or *nodD2* (*nodD1*-OE and *nodD2*-OE) harbouring *DsRed* fluorescent marker. The number of plants with infection threads or nodules is indicated on the top right-hand side of each image. Scale bar: 200 μ m.

and nodules were formed (Fig. 2D). These data suggest that NodD1 is required for IT formation in *L. burtii*. After inoculation with the $\Delta nodD2$ mutant, the proportion of plants presenting ITs (4/20) was similar to the WT strain (5/20). These results suggest that NodD2 is not essential for IT formation. To confirm whether NodD2 alone contributes to IT formation, we quantified IT numbers in the plants inoculated with

nodD2-LE and found that 3/30 plants presented IT formation, a similar level to the plants inoculated with the *nodD1*-LE strain (4/30), suggesting that NodD2 also has a role in intracellular colonization.

We then investigated if the overexpression of NodD1 or NodD2 increases incidences of IT-type colonization. We found that *nodD1*-OE slightly increased the proportion of

ITs compared with the WT (32% versus 25%, respectively). Excitingly, the plants inoculated with the *nodD2*-OE largely increased the proportion of ITs (62%). In summary, these data suggest that NodD2 has a role in IT formation and the overexpression of NodD2 increases IT-type colonization.

Nodule formation and colonization can be extended to other rhizobial strains by overexpression of NodD2 of CIAT 899

Sinorhizobium fredii HH103 (hereafter HH103)—a phylogenetically distant rhizobial strain from CIAT 899—cannot form nodules in *P. vulgaris* but forms white (non-colonized) nodules in *L. japonicus* and nitrogen-fixing nodules in *L. burtii* by intercellular infection (Fuentes-Romero *et al.*, 2022). Interestingly, HH103 derivative strains overproducing NF gain the capacity for IT colonization in both *Lotus* plants and, most importantly, fully colonize nodules in *L. japonicus* (Acosta-Jurado *et al.*, 2019).

To determine whether CIAT 899 NodD2 can also extend symbiotic ability in another rhizobial species, we introduced the *nodD2*-OE vector into HH103. Excitingly, HH103 *nodD2*-OE formed white (non-colonized) nodules in *P. vulgaris*, whereas the WT stain could not (Fig. 3A). This result suggests that the CIAT 899 constitutively active NodD2 protein can extend the host range of HH103. In *L. japonicus*, HH103 formed white nodules, but the HH103 *nodD2*-OE formed both white and pink nodules (Fig. 3B). This result shows that NodD2 can promote root and nodule colonization even in a different rhizobial strain. Finally, in *L. burtii*, HH103 *nodD2*-OE formed more effective (pink) nodules than WT HH103

(Fig. 3C). These results indicate that NodD enhances symbiotic efficiency in *S. fredii* HH103.

Discussion

The success of the rhizobium–legume symbiotic interaction, including root infection, nodule formation and invasion, depends on the ability of the bacteria to recognize specific flavonoids released by the roots. NodD proteins are important determinants of host-range specificity: they bind only to compatible flavonoids to initiate the transcription of the *nod* genes and subsequent progression of the symbiotic process (Horvath *et al.*, 1987; Spaink *et al.*, 1989). Increasing compatibility between rhizobia and legume hosts could benefit sustainable agriculture (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2020b). Thus, different studies have aimed to reduce the specificity of this symbiotic interaction; for example, specific mutations or amino acid substitutions in the NodD protein exhibit a flavonoid-independent transcriptional activation (FITA mutants) of the *nod* genes and therefore NF synthesis (McIver *et al.*, 1989; Vinardell *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2009; Peck *et al.*, 2013). A recent study suggested that rhizobia could harbour naturally active NodD proteins as some species of *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* presented a NodD2 copy which may induce the *nod* genes without flavonoid inducers (Ferguson *et al.*, 2020). Here, we have demonstrated by β -galactosidase assays and qRT-PCR that *R. tropici* CIAT 899 NodD2 alone can induce the *nod* genes in the absence of inducers (Fig. 1). In our previous studies, we found that *nodD2* expression was induced by osmotic stress (salt or mannitol) but not by the flavonoid apigenin and we demonstrated that the activation of downstream *nod* genes under these conditions was

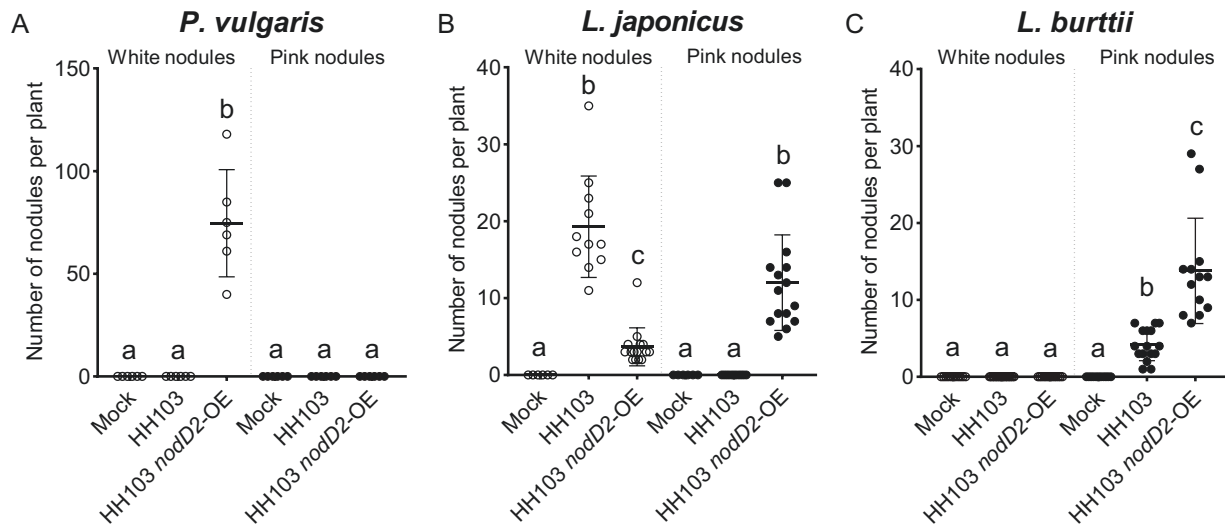


Fig. 3. Overexpression of *Rhizobium tropici* CIAT 899 *nodD2* extends the host range of *Sinorhizobium fredii* HH103. Numbers of white (non-colonized) and pink (nitrogen-fixing) nodules in *P. vulgaris* (A), *L. burtii* (B), and *L. japonicus* (C) plants quantified 30 (A) or 50 (B, C) days post-inoculation with *Sinorhizobium fredii* HH103 strain containing the *nodD2*-OE vector. Plots represent the means (lines), standard deviation (error bars), and individual biological replicates (dots). A one-way ANOVA was used to test for differences between mutants with a Tukey correction for multiple comparisons (same letters represent no significant difference at 0.05% level).

- involved in Nod factor synthesis and symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* **86**, e01297-20.
- del Cerro P, Megías M, López-Baena FJ, Gil-Serrano AM, Pérez-Montaño F, Ollero FJ.** 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-Montaño F, Gil-Serrano A, López-Baena FJ, Megías M, Hungria M, Ollero FJ.** 2017. The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Scientific Reports* **7**, 46712.
- del Cerro P, Rolla-Santos AA, Gomes DF, et al.** 2015a. Opening the 'black box' of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics* **16**, 864.
- del Cerro P, Rolla-Santos AA, Gomes DF, et al.** 2015b. 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.
- Dénarié J, Debelle F, Prome JC.** 1996. *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **65**, 503–535.
- Ferguson S, Major AS, Sullivan JT, Bourke SD, Kelly SJ, Perry BJ, Ronson CW.** 2020. *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NodD2 enhances competitive nodule colonization in the clover-rhizobium symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* **86**, e01268-20.
- Fisher RF, Egelhoff TT, Mulligan JT, Long SR.** 1988. Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes and Development* **2**, 282–293.
- Fuentes-Romero F, Navarro-Gómez P, Ayala-García P, Moyano-Bravo I, López-Baena FJ, Pérez-Montaño F, Ollero FJ, Acosta-Jurado S, Vinardell JM.** 2022. The *nodD1* gene of *Sinorhizobium fredii* HH103 restores nodulation capacity on bean in a *Rhizobium tropici* CIAT 899 *nodD1/nodD2* mutant, but the secondary symbiotic regulators *nodR*, *nodD2* or *syrm* prevent HH103 to nodulate with this legume. *Microorganisms* **10**, 139.
- González-Sama A, Lucas MM, de Felipe MR, Pueyo JJ.** 2004. An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytologist* **163**, 371–380.
- Goormachtig S, Capoen W, James EK, Holsters M.** 2004. Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **101**, 6303–6308.
- Hassan S, Mathesius U.** 2012. The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3429–3444.
- Horvath B, Bachem CW, Schell J, Kondorosi A.** 1987. Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant-signal, interacting with the *nodD* gene product. *The EMBO Journal* **6**, 841–848.
- Hou B, Li F, Yang XE, Hong G.** 2009. A small functional intramolecular region of NodD was identified by mutation. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* **4**, 822–830.
- Hungria M, Andrade DS, Chueire LMO, Probanza A, Gutiérrez-Mañero FJ, Megías M.** 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**, 1515–1528.
- Iyngaran P, Madden DC, Jenkins SJ, King DA.** 2011. Hydrogenation of N over Fe{111}. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **108**, 925–930.
- Jiménez-Guerrero I, Acosta-Jurado S, Medina C, Ollero F, Alias-Villegas C, Vinardell JM, Pérez-Montaño F, López-Baena FJ.** 2020a. The *Sinorhizobium fredii* HH103 type III secretion system effector NopC blocks nodulation with *Lotus japonicus* Gifu. *Journal of Experimental Botany* **71**, 6043–6056.
- Jiménez-Guerrero I, Moreno N, Pérez-Montaño F.** 2020b. One door closes, another opens: when nodulation impairment with natural hosts extends rhizobial host-range. *Environmental Microbiology* **23**, 1837–1841.
- Kawaharada Y, Nielsen MW, Kelly S, et al.** 2017. Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia. *Nature Communications* **8**, 14534.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ.** 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols* **10**, 845–858.
- Kelly SJ, Muszyński A, Kawaharada Y, Hubber AM, Sullivan JT, Sandal N, Carlson RW, Stougaard J, Ronson CW.** 2013. Conditional requirement for exopolysaccharide in the *Mesorhizobium-Lotus* symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**, 319–329.
- Kelly S, Sullivan JT, Kawaharada Y, Radutoiu S, Ronson CW, Stougaard J.** 2018. Regulation of Nod factor biosynthesis by alternative NodD proteins at distinct stages of symbiosis provides additional compatibility scrutiny. *Environmental Microbiology* **20**, 97–110.
- Kostiuk NV, Belyakova MB, Leshchenko DV, Miniaev MV, Petrova MB, Kharitonova EA.** 2013. Structural characterization of the NodD transcription factor. *American Journal of Bioinformatics Research* **3**, 35–41.
- Long SR.** 2016. SnapShot: signaling in symbiosis. *Cell* **167**, 582.
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA.** 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**, 417–426.
- McIver J, Djordjevic MA, Weinman JJ, Bender GL, Rolfe BG.** 1989. Extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* caused by point mutations in *nodD* that result in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2**, 97–106.
- Miller JH.** 1972. *Experiment in molecular genetics*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Montiel J, Reid D, Grønbaek TH, Benfeldt CM, James EK, Ott T, Ditengou FA, Nadzieia M, Kelly S, Stougaard J.** 2021. Distinct signaling routes mediate intercellular and intracellular rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **185**, 1131–1147.
- Oldroyd GE.** 2013. Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews. Microbiology* **11**, 252–263.
- Ormeño-Orrillo E, Menna P, Almeida LG, et al.** 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.
- Peck MC, Fisher RF, Bliss R, Long SR.** 2013. Isolation and characterization of mutant *Sinorhizobium meliloti* NodD1 proteins with altered responses to luteolin. *Journal of Bacteriology* **195**, 3714–3723.
- Peck MC, Fisher RF, Long SR.** 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **188**, 5417–5427.
- Pei J, Kim BH, Grishin NV.** 2008. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. *Nucleic Acids Research* **36**, 2295–2300.
- Pérez-Montaño F, del Cerro P, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Cubo MT, Hungria M, Megías M, Ollero FJ.** 2016. RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics* **17**, 198.
- Pfaffl MW.** 2001. New mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, et al.** 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**, 585–592.
- Rodríguez-López J, López AH, Estrada-Navarrete G, Sánchez F, Díaz-Camino C.** 2019. The noncanonical heat shock protein Pv Nod22 is

essential for infection thread progression during rhizobial endosymbiosis in common bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **32**, 939–948.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schlaman HRM, Phillips DA, Kondorosi E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In: Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJJ, eds. *The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria*. Kluwer Academic Publishers, 361–386.

Simon R. 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. *Molecular and General Genetics* **196**, 413–420.

Spaink HP, Aarts A, Stacey G, Bloemberg GV, Lugtenberg BJ, Kennedy EP. 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**, 72–80.

Spaink HP, Okker RJ, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJ. 1989. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1. *Plant Molecular Biology* **9**, 27–39.

Sprent JI. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytologist* **174**, 11–25.

Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* **418**, 671–677.

Vinardell JM, López-Baena FJ, Hidalgo A, et al. 2004. The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *Sinorhizobium fredii* varies in a chromosomal-background-dependent manner. *Archives of Microbiology* **181**, 144–154.

Vincent JM. 1970. The modified Fåhræus slide technique. In: *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook No. 15. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 144–145.

Walker L, Lagunas B, Gifford ML. 2020. Determinants of host range specificity in legume-rhizobia symbiosis. *Frontiers in Microbiology* **11**, 585749.

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. 2009. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191.

White PJ, Brown PH. 2010. Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany* **105**, 1073–1080.

Woods J, Williams A, Hughes JK, Black M, Murphy R. 2010. Energy and the food system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**, 2991–3006.

Yeh KC, Peck MC, Long SR. 2002. Luteolin and GroESL modulate in vitro activity of NodD. *Journal of Bacteriology* **184**, 525–530.

Zaat SA, Wijffelman CA, Spaink HP, van Brussel AA, Okker RJ, Lugtenberg BJ. 1987. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1J1 by plant flavanones and flavones. *Journal of Bacteriology* **169**, 198–204.

Figuras suplementarias capítulo 2

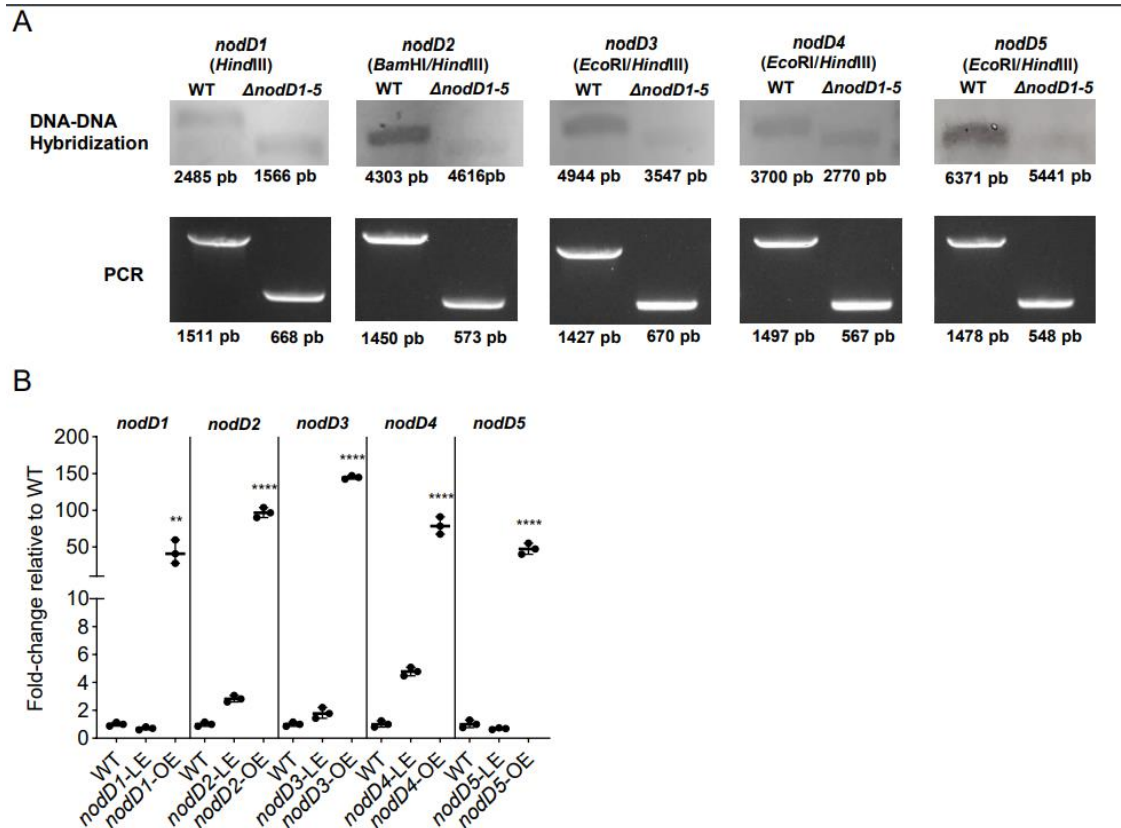


Figure S1. Relative gene expression of *Rhizobium tropici* CIAT 899 *nodD1*, *nodD2*, *nodD3*, *nodD4*, and *nodD5* in a quintuple deletion mutant strain expressing the five *nodD* genes individually at low (LE) or high (OE) levels. **(A)** DNA-DNA hybridization and PCR plots showing deletion of each *nodD* gene in the quintuple deletion mutant strain $\Delta nodD1-5$. **(B)** Gene expression of *R. tropici* CIAT 899 *nodD1*, *nodD2*, *nodD3*, *nodD4*, and *nodD5* in WT, OE, and LE strains. Expression levels were measured by RT-qPCR, normalized to 16S, and plotted relative to WT. Plots represent the means (lines), standard deviation (error bars), and individual biological replicates (dots). A one-way ANOVA was used to test for differences between mutants with their corresponding WT with a Dunnett correction for multiple comparisons. ** $P < 0.01$; **** $P < 0.0001$.

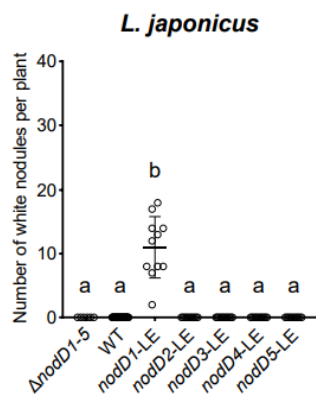


Figure S2. Number of white (non-colonized) nodules in *L. japonicus* plants quantified 50 days post-inoculation (dpi) with *R. tropici* CIAT 899 WT; quintuple *nodD* mutant ($\Delta nodD1-5$); *nodD1*-LE, *nodD2*-LE, *nodD3*-LE, *nodD4*-LE, and *nodD5*-LE strains. Plots represent the means (lines), standard deviation (error bars), and individual biological replicates (dots). A one-way ANOVA was used to test for differences between mutants with a Tukey correction for multiple comparisons (same letters represent no significant difference at 0.05% level).

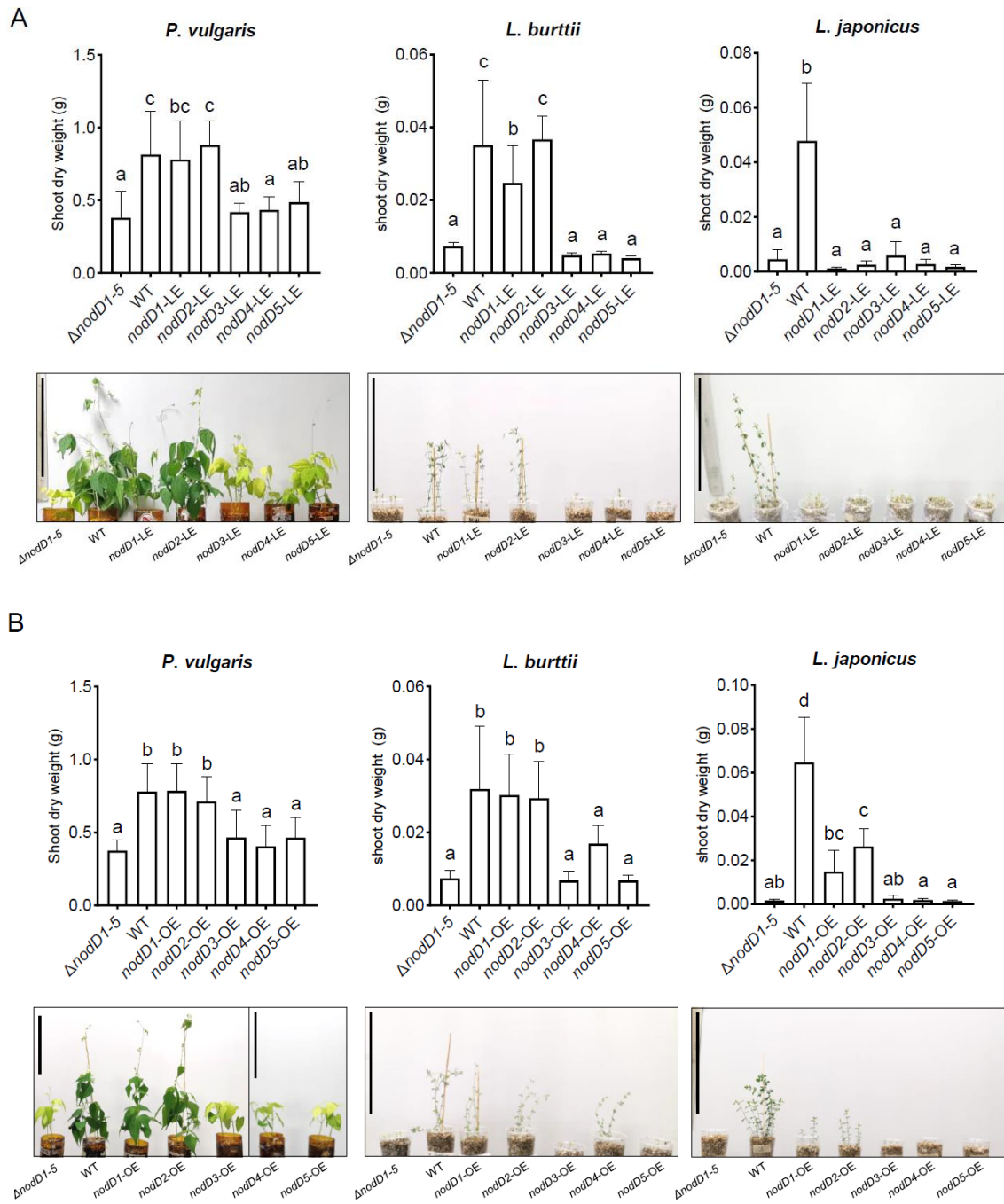


Figure S3. Shoot dry weights (SDW) in *Phaseolus vulgaris*, *Lotus japonicus*, and *Lotus burtii* plants inoculated with WT, *nodD*-LE (A) and *nodD*-OE (B) strains. SDW and representative photographs of the *P. vulgaris*, *L. japonicus*, and *L. burtii* plants 30 dpi (*P. vulgaris*) or 50 dpi (*L. japonicus*, and *L. burtii*). Plots represent the means (bars), and standard deviation (error bars). A one-way ANOVA was used to test for differences between mutants with a Tukey correction for multiple comparisons (same letters represent no significant difference at 0.05% level). Scale bar = 30 cm.

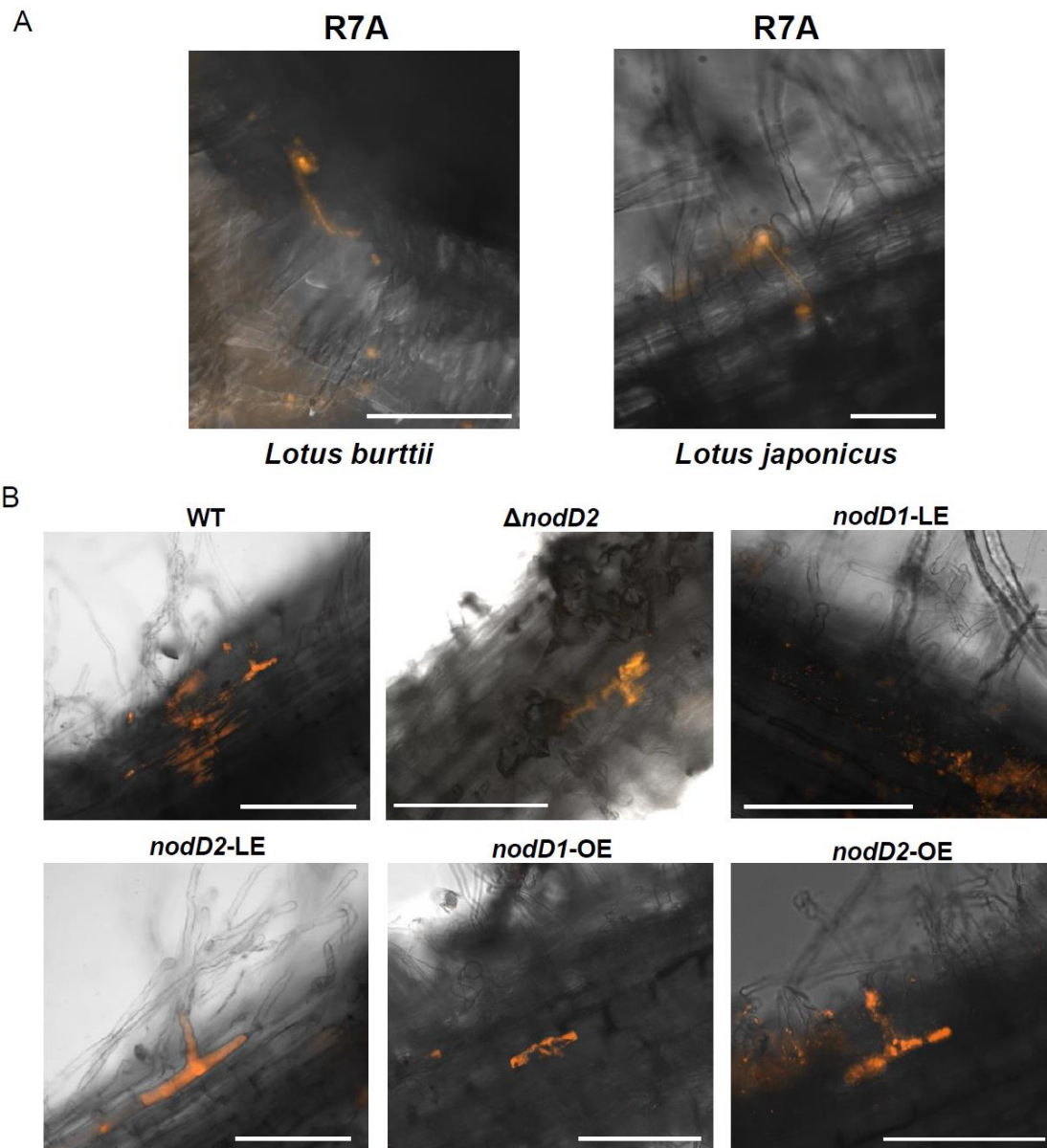
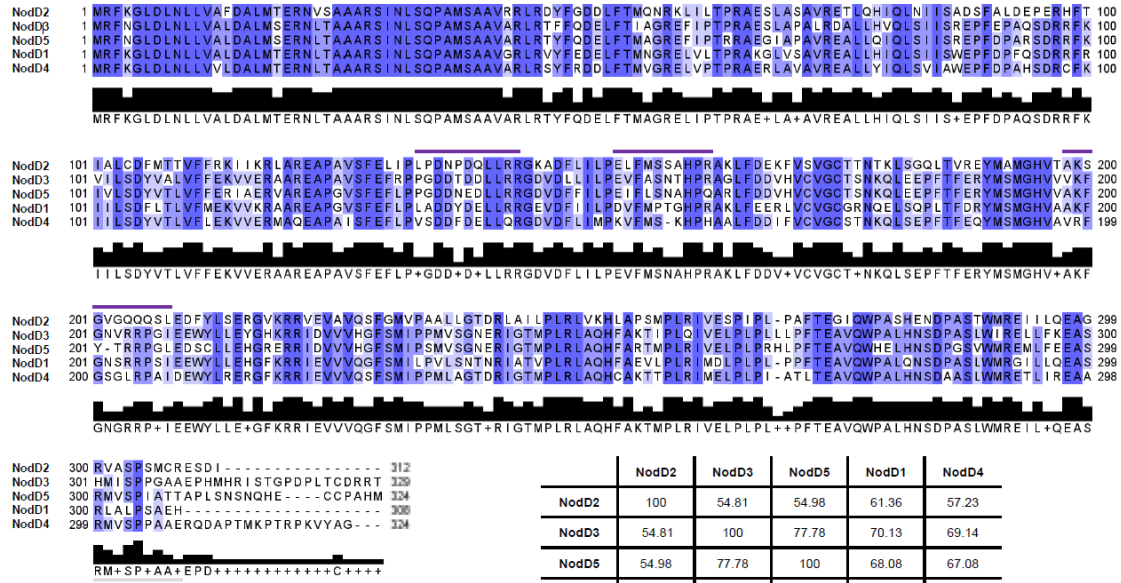


Figure S4. (A). Infection threads of *Lotus burtii* and *Lotus japonicus* plants inoculated with *Mesorhizobium loti* R7A strain harbouring *DsRed* fluorescent marker. Scale bar = 100 μ m. (B). Intercellular entry of *L. burtii* plants inoculated with *R. tropici* CIAT 899 WT, single deletion mutant $\Delta nodD2$, and quintuple deletion mutant strains expressing *nodD1* or *nodD2* (*nodD1*-LE, *nodD2*-LE, *nodD1*-OE, and *nodD2*-OE) and harbouring *DsRed* fluorescent marker. Scale bar = 200 μ m.

A



Percentage identity matrix

B

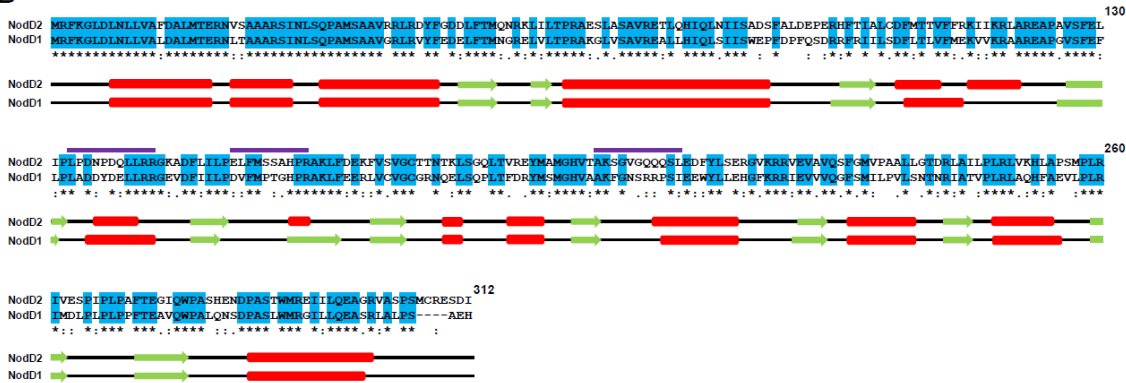


Figure S5. Amino acid alignments of *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD1, NodD2, NodD3, NodD4, and NodD5 proteins. (A) Sequence alignment and percentage identity matrix made using Clustal2.1. In sequence alignment, conserved amino acids are highlighted in blue, black bars below represent conserved sequence similarity, and amino acid indicated below represents the most prevalent amino acid. (B) Sequence alignment and predicted secondary structure of NodD1 and NodD2. Conserved amino acids are highlighted in blue. Identical amino acid residues are indicated by (*), similar residues by a colon(:), semi-conserved residues by (.) and no residue by a (-). Red bars and green arrows indicate predicted α -helix and β -sheet secondary structures, respectively. Purple lines correspond to the three predicted ligand-binding domains.

CAPÍTULO 3.

Isolation, quantification, and visualization
of extracellular membrane vesicles in
rhizobia under free-living conditions.



Isolation, Quantification, and Visualization of Extracellular Membrane Vesicles in Rhizobia Under Free-Living Conditions

Paula Ayala-García, Natalia Moreno-de Castro, Irene Jiménez-Guerrero, Mathias Müsken, Alejandro Arce-Rodríguez, Francisco Pérez-Montaño, and José Manuel Borrero-de Acuña

Abstract

Rhizobia are a group of soil proteobacteria that are able to establish a symbiotic interaction with legumes. These bacteria are capable to fix atmospheric nitrogen into ammonia within specific plant root organs called nodules. The rhizobia-legume interaction is established by a complex molecular dialogue that starts with flavonoids exudated by the plant roots. In response, signaling molecules known as Nod factors (NFs) are secreted by the bacteria. These factors are sensed by specific plant receptors that trigger a downstream signaling cascade leading to rhizobium-specific intracellular colonization of the root hair via the formation of infection threads and the eventual development of nodules on roots. In these organs, rhizobia can fix nitrogen from the atmosphere for the plant in exchange for photosynthates and the appropriate environment for nitrogen fixation. Recently, it has been demonstrated that extracellular membrane vesicles (EMVs) produced by some rhizobia carry NFs. EMVs are proteolipidic structures that are secreted to the milieu from the bacterial membranes and are involved in several important biological processes, including intercellular communication. Thus far, little is known about rhizobia vesicles, and further studies are needed to understand their functions, including their role as transporting vessels of signaling molecules during the process of symbiosis. Here, we present a detailed protocol to isolate high-purity EMVs from free-living cultured rhizobia, test their integrity, and quantify their abundance.

Key words Rhizobium, Symbiosis, Flavonoids, Nodulation factors, Extracellular membrane vesicles

1 Introduction

Nitrogen is an essential macronutrient for plant growth and crop yields, typically supplied to crops as fertilizers when phytoavailability is low [1]. Despite of their relevance, the industrial synthesis of N-fertilizers contributes to the production of greenhouse gases [2],

These two authors contributed equally to this work.

and its use in agriculture provokes eutrophication processes in water [3]. Therefore, alternative means are needed to supply crops with nitrogen, such as the use of rhizobia in symbiosis with legume plants. Rhizobia are a group of soil proteobacteria that are able to establish a symbiotic interaction with legumes, in order to fix atmospheric nitrogen into ammonia inside specialized root organs called nodules. By such means, rhizobia increase the nitrogen availability to the host plant and improve plant performance [4], which makes the rhizobial biofertilization of legumes a highly advantageous strategy for a sustainable and environment-friendly agriculture.

The rhizobium-legume symbiotic interaction is established by a complex molecular dialogue that starts with flavonoids exuded from legume roots into the rhizosphere. Compatible flavonoids are recognized by rhizobial NodD transcriptional regulators [5] that in turn activates the expression of the bacterial *nod* genes [6, 7]. These genes encode the Nod proteins that are involved in the synthesis and export of specific lipo-chitooligosaccharides molecules, also known as Nod factors (NFs) [8]. These NFs are then recognized by specific plant LysM receptor-like kinases triggering a downstream transduction cascade. This signaling process leads to root hair tissue differentiation and reorganization, and rhizobium-specific intracellular colonization usually through the formation of infection threads, which culminates with the nodule development [9]. Besides the initial molecular recognition mediated by flavonoids and NFs, other types of bacterial molecules are necessary for a successful nodulation process, such as surface polysaccharides or proteins secreted through the type III secretion system [10].

Although the nodulation process has been extensively studied, additional players of the molecular crosstalk are still to be determined. In this context, several studies have highlighted the essential role of extracellular membrane vesicles (EMVs) in bacterial-bacterial communication and bacterial-host interactions [11]. The EMVs are spherical, mono- or bilayer lipidic structures of nanometric size (typically from 20 to 400 nm) that are released into the external milieu, playing a role in several biological processes. For example, EMVs can be fused with membranes of other bacteria or can be internalized into eukaryotic cells, releasing their content and, thus, operating as transport vessels [12–15]. This interplay has recently been proposed to add an additional layer in the molecular dialogue of the holobiont [16]. In the case of the rhizobium-legume symbiosis, during the infective process many physiological changes take place, some of which might be mediated by these membranous vehicles. Supporting these suggestions, recent studies have discovered the presence of NFs inside of EMVs of *Rhizobium etli* exclusively when grown in the presence of naringenin, a flavonoid that induce the expression of this bacterium *nod* genes

[17]. This finding could be pointing out a new way of bacterium-plant interaction wherein the NFs are being transported from the rhizobium to the plant.

Here we describe a detailed protocol to isolate high-purity rhizobial EMVs in free-living conditions. The model organism used for developing this protocol is *Rhizobium tropici* CIAT899, a broad host range rhizobial strain that nodulates some legumes, including *Lotus japonicus*, *Lotus burttii*, and the economically relevant crop *Phaseolus vulgaris*. This bacterium also presents high tolerance to external stress – such as high levels of acidity or high temperatures – and has a great diversity of Nod factors [18]. Besides, this bacterium has the capacity to produce these signaling molecules in acid and saline environments or in the absence of molecular signals from the plant [19–22]. The methodology for EMVs isolation is a stepwise process of centrifugation, filtration, ultrafiltration, and ultracentrifugation, in order to separate the vesicles from the rest of the cellular and culture media constituents and concentrate them. Following the isolation, we apply different techniques to evaluate the vesicles integrity and quantity.

2 Materials

The following protocol requires standard equipment found in microbiology and molecular biology laboratories. These include an autoclave, biological laminar flow hood, incubator, shaker, refrigerator, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ freezers, spectrophotometer, centrifuges, plate reader, vacuum pump, pipettes, scale, etc. Special equipment required in this protocol encompass ultracentrifuge, a NanoSight and a transmission electron microscope (*see* below). In addition, routine microbiology and molecular materials and devices are needed, including pipettors, forceps, plastic tips, tubes with different volumes, laboratory glass bottles, Erlenmeyer flasks, Petri dishes, media components, sterile ultrafiltered water, syringe filters, etc.

2.1 Bacterial Strains and Culture Medium

1. Bacterial strains: *Rhizobium tropici* CIAT899.
2. Tryptone yeast (TY) medium: dissolve 3 g yeast extract, 5 g tryptone, and 0.65 g $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 1 L of distilled water. Add agar 2% for TY agar plates. Autoclave at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min.
3. 3.7 mM apigenin: dissolve 1 mg apigenin in 1 mL of 100% ethanol.
4. 0.5 M NaOH: dissolve 20 g sodium hydroxide in 1 L of distilled water.

**2.2 Centrifugation
Process**

1. Beckman Coulter Avanti J-E series centrifuge.
2. JA-14 centrifuge rotor.
3. 200 mL centrifuge bottles.

**2.3 Filtration
Process**

1. 150 mL bottle with a 0.2 µm polyether sulfone bottle top filter.
2. Vacuum pump.
3. 50 mL syringe.
4. Syringe filter (0.2 µm pore size).

**2.4 Ultrafiltration
Process**

1. Vivaflow 50R easy load ultrafiltration system.
2. Vivaflow 50R 30,000 MWCO Hydrosart membrane.

**2.5
Ultracentrifugation
Process**

1. Beckman Optima L-90K ultracentrifuge.
2. 45 Ti ultracentrifuge rotor.
3. 70.1 Ti ultracentrifuge rotor.
4. 70 mL capacity ultracentrifuge tubes.
5. 8 mL capacity ultracentrifuge tubes.
6. 20 mMHEPES buffer: dissolve 238.3 g HEPES and 90 g NaCl in 1 L distilled water. pH 7.0.

**2.6 Integrity
Evaluation and
Quantification Assays**

1. Sputter coater with carbon evaporation function.
2. Carbon coated-mica.
3. Uranyl acetate solution: dissolve 40 mg uranyl acetate in 1 mL distilled water.
4. Transmission electron microscope (TEM).
5. 10X FM4-64 (*N*-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide) fluorescent membrane dye: dissolve 100 µg FM4-64 in 2 mL sterile distilled water (50 µg/mL). Store at 4 °C.
6. Hanks balanced salt solution (HBSS): dissolve 0.4 g KCl, 0.06 g KH₂PO₄, 8 g NaCl, 0.05 g Na₂HPO₄, and 1 g glucose in 1 L of distilled water. Store at 4 °C.
7. 96-well microtiter plate.
8. Multiplate reader.
9. NanoSight NS300 Marvern Panalytical nanoparticle analyzer equipped with a 488 nm laser module.

3 Methods

Prepare the solutions using distilled water or analytical grade reagents and use sterilized materials. Most manipulations must be

done under aseptic conditions, with the employment of a laminar flow cabinet being strongly recommended. Carefully follow the waste disposal regulations of your institution/local government for the management of waste materials.

3.1 EMVs Isolation

1. Inoculate a fresh colony of *R. tropici* CIAT899 in an Erlenmeyer flask containing 10 mL of TY medium. Incubate for 72 h at 28 °C with continuous shaking at 180 rpm.
2. Inoculate 3 mL of the saturated culture in a 1 L Erlenmeyer flask containing 300 mL of TY medium. Supplement with 300 µL of apigenin (3.7 mM) or 300 µL of 100% ethanol as negative control (*see Note 1*). Grow at 28 °C with continuous shaking at 180 rpm.
3. Grow the culture to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.7–0.8 (around 16 h).
4. Distribute the culture into 2 200 mL centrifuge bottles (150 mL each). Centrifuge at $5000 \times g$ for 30 min.
5. Pour the supernatants into new 200 mL centrifuge bottles (discard the pellet). Centrifuge again at $7000 \times g$ for 30 min.
6. Mix the supernatants in a clean 500 mL bottle. Filter the supernatant with a standard vacuum filtration system, and use bottles with a 0.2 µm polyethersulfone bottle top filter. Keep the sterile eluent at 4 °C (*see Note 2*).
7. Concentrate the eluent from 300 to 50 mL with the Vivaflow 50R easy load ultrafiltration system using Vivaflow 50R 30,000 (kDa) MWCO Hydrosart membranes and following manufacturer instructions (*see Notes 3 and 4*).
8. Filter the concentrated supernatant using a 50 mL syringe and a 0.2 µm filter.
9. Transfer the whole concentrated supernatant into 70 mL ultracentrifuge tubes. Use sterile TY and a precision scale to even the weight of the tubes (*see Note 5*). Centrifuge at $100,000 g$ and 4 °C for 2 h using 45 Ti ultracentrifuge rotor.
10. Remove completely the supernatant using a micropipette to ensure that there is no liquid left, but take care to not disturb the pellet. Carefully resuspend the pellet in 300 µL of ice-cold HEPES buffer.
11. For proteomic purposes, heat at 65 °C for 5 min to avoid flagellin contamination, scale up to 5 mL with ice-cold HEPES buffer and ultracentrifuge again with the same conditions using 8 mL ultracentrifuge tubes and 70.1 Ti ultracentrifuge rotor (*see Note 6*).

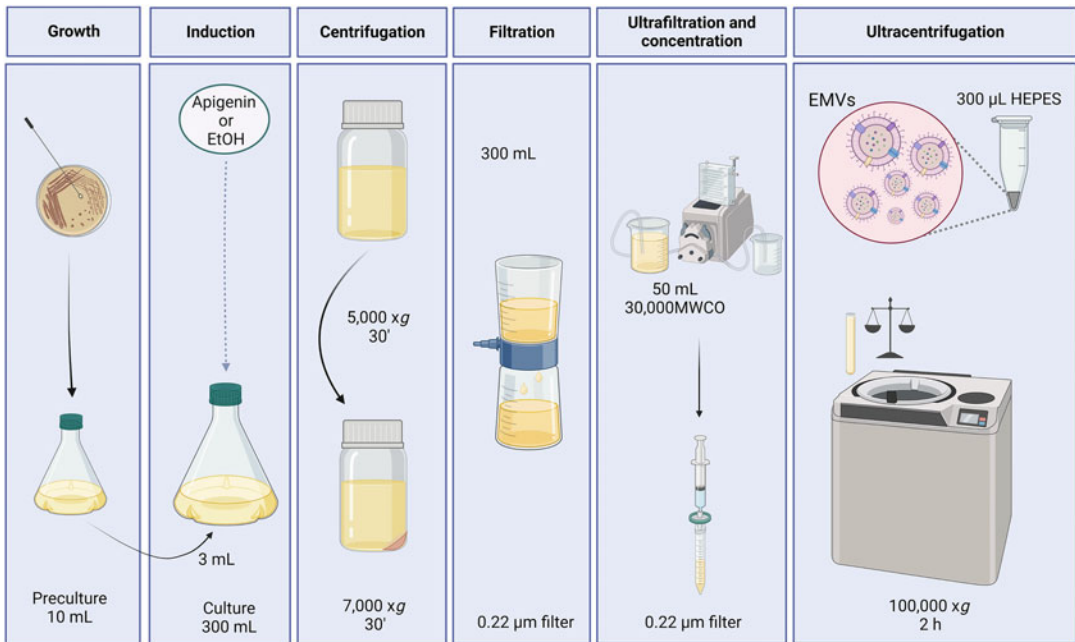


Fig. 1 Workflow described in this chapter for the rhizobial extracellular membrane vesicles (EMVs) isolation cultured in free-living conditions

12. Carefully resuspend the pellet in 300 µL of ice-cold HEPES buffer. Store the vesicle containing samples at 4 °C. Sample is stable for months (Fig. 1).

3.2 Microscopy for EMVs Integrity Evaluation

For the negative staining of EMVs, use the grid-on drop method with droplets of approx. 30–50 µL.

1. Prepare carbon-coated mica by vacuum evaporation on a freshly cleaved mica beforehand (*see Note 7*).
2. Cut a piece of parafilm to allow the pipetting of 4 droplets in a row next to each other, and plan the according number of rows in dependence of your sample number (drop 1: sample, drop 2 + 3: distilled water, drop 4: 4% aqueous uranyl acetate).
3. Take a small piece of a carbon-coated mica and apply it to the sample drop to float off the carbon support film.
4. After 30–60 s, overlay the carbon film with a cooper grid (300 mesh) and lift it up together with adsorbed molecules.
5. Wash the grid on the two droplets of distilled water by dipping it in and out.
6. Carefully take away the excessive liquid by a filter paper.
7. Put the grid on a drop with 4% (w/v) aqueous uranyl acetate.

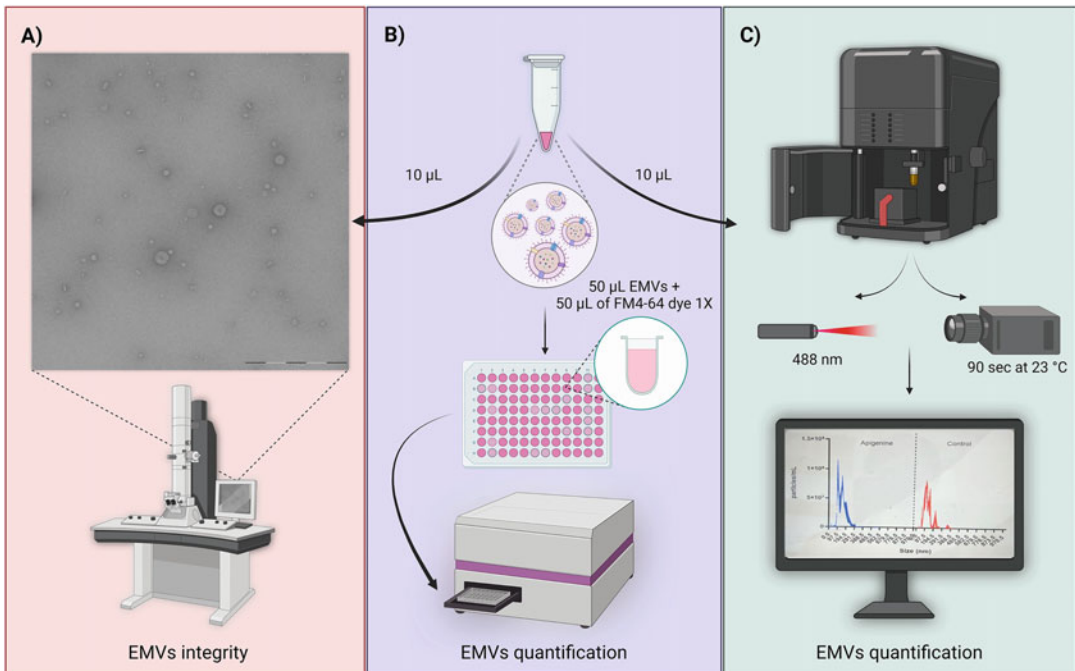


Fig. 2 Extracellular membrane vesicles (EMVs) integrity and quantification analyses described in this chapter. (a) EMVs evaluation by Transmission Electron Microscopy analysis. (b) EMVs quantification using the FM4-64 lipid dye staining and (c) nanoparticle tracking analysis by means of the NanoSight system

8. Lift up the grid after 45 s and take away the excessive liquid with a filter paper before heat-drying the grid by the heat of a filament lamp (*see Note 8*).
9. Examine the samples at the TEM to evaluate the vesicles integrity (Fig. 2a). We used a Zeiss Libra 120 Plus at an acceleration voltage of 120 kV and at calibrated magnifications.

3.3 Lipid Dye for EMVs Quantification

1. Prepare the FM4-64 dye 1X mixing 500 µL of FM4-6410X and 4.5 mL of HBSS.
2. Mix 50 µL of each EMVs sample with 50 µL of FM4-64 dye 1X. As blank control, mix 50 µL of HEPES buffer with 50 µL of FM4-64 dye 1X (*see Note 9*).
3. Add the individual samples into a 96-well microtiter plate and introduce it in a multiplate reader.
4. Measure the fluorescence of the samples using an excitation/emission wavelength range of 558 nm/734 nm (Fig. 2b).

3.4 Nanoparticle Tracking Analysis for EMVs Quantification

1. Dilute the EMVs sample to a protein concentration of 0.1 µg/mL (*see Note 10*).

2. Apply a monochromatic laser beam at 488 nm to the EMVs sample using the NanoSight NS300 Marvern Panalitycal nanoparticle analyzer.
3. From each sample, take 90 s videos at 23 °C.
4. Analyze particle movement by nanoparticle tracking analysis software with the minimal expected particle size, minimum track length, and blur setting all set to automatic.
5. Analyze each video with the nanoparticle tracking analysis software following manufacturer's instructions to quantify and size EMVs (Fig. 2c).

4 Notes

1. 100% ethanol is added to TY medium as a control, since apigenin is dissolved in this organic solvent.
2. From this point on, all the steps must be carried out on ice or at low temperatures (4 °C). Moreover, the use of gloves is highly recommended.
3. Before using the ultrafiltration system, wash the container with distilled water and subsequently with 100% ethanol. Between samples, wash the container with distilled water, with 0.5 M NaOH solution, and then again with distilled water. Before storing the system, wash it with 0.5 M NaOH and distilled water. Finally, add 10% ethanol into the filter and store it at 4 °C. Wash all hoses with distilled water.
4. Once the desired volume is reached in the upper section of the concentrator device, resuspend with a micropipette to make sure all the vesicles are separated from the membrane.
5. The weight of the samples into the tubes must be equilibrated to the milligram before carrying on with the ultracentrifugation.
6. Skip this step if EMV samples are not subsequently analyzed by proteomics.
7. Freshly cleaved mica should be prepared 1 day before use and can be used for weeks.
8. Make sure that uranyl acetate waste (radioactive!) is properly disposed.
9. Depending on total EMVs concentration, samples can require a previous dilution to optimize lipid quantification.
10. Normalization of the total protein amount in each sample can be determined using standard protein concentration assays, such as Bradford, BCA assay, Nanodrop, or other method compatible with your sample.

Acknowledgments

This work was supported by research grants: EMERGIA20_00048 from the Junta de Andalucía, Consejería de transformación económica, industria, conocimiento y universidades, the ProyExcel_00450 from the Junta de Andalucía, Consejería de Universidad, Investigación e Innovación, the PID2021-122395OA-I00 and the PID2020-118279RA-I00 from the Spanish Ministry of Science and Innovation. We thank Ina Schleicher for EM sample preparation.

References

- White P J, Brown P (2010) Plant nutrition for sustainable development and global health. *Ann Bot* 105:1073–1080
- Smith P, Martino D, Cai Z et al (2008) Greenhouse gas mitigation in agriculture. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363:789–813
- Conley D J, Paerl H W, Howarth R W et al (2009) Controlling eutrophication: nitrogen and phosphorus. *Science* 323:1014–1015
- Oldroyd GE (2013) Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11:252–263
- Cooper JE (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol* 103:1355–1365
- Spaink HP, Kondorosi A, Hooykaas PJ (eds) (2012) *The Rhizobiaceae: molecular biology of model plant-associated bacteria*. Springer Science & Business Media, Dordrecht, Boston: Kluwer Academic
- Peck MC, Fisher RF, Long SR (2006) Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol Res* 188:5417–5427
- Dénarié J, Debellé F, Promé JC (1996) *Rhizobium* lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* 65:503–535
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB et al (2003) Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* 425:585–592
- López-Baena FJ, Ruiz-Sainz JE, Rodríguez-Carvajal MA et al (2016) Bacterial molecular signals in the *Sinorhizobium fredii*-soybean symbiosis. *Int J Mol Sci* 17:755
- Borrero de Acuña JM, Bernal P (2021) Plant holobiont interactions mediated by the type VI secretion system and the membrane vesicles: promising tools for a greener agriculture. *Environ Microbiol* 23:1830–1836
- Turnbull L, Toyofuku M, Hynen AL et al (2016) Explosive cell lysis as a mechanism for the biogenesis of bacterial membrane vesicles and biofilms. *Nat Commun* 7:1–13
- Orench-Rivera N, Kuehn MJ (2016) Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cell Microbiol* 18:1525–1536
- Bitto NJ, Chapman R, Pidot S et al (2017) Bacterial membrane vesicles transport their DNA cargo into host cells. *Sci Rep* 7:1–11
- Toyofuku M, Nomura N, Eberl L (2019) Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol* 17:13–24
- Middleton H, Yergeau É, Monard C et al (2021) Rhizospheric plant–microbe interactions: miRNAs as a key mediator. *Trends Plant Sci* 26:132–141
- Taboada H, Dunn MF, Meneses N et al (2019) Qualitative changes in proteins contained in extracellular membrane vesicles produced by *Rhizobium etli* grown in the presence of the nod gene inducer naringenin. *Arch Microbiol* 201:1173–1194
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM et al (1991) *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int J Syst Evol Microbiol* 41:417–426
- del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF et al (2015) Opening the “black box” of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT899. *BMC Genomics* 16:1–10
- del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF et al (2015) Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 and their roles in the early stages of molecular signaling and host-legume nodulation. *BMC Genomics* 16:1–13

21. del Cerro P, Pérez-Montaña F, Gil-Serrano A et al (2017) The *Rhizobium tropici* CIAT899 NodD2 protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Sci Rep* 7:46712
22. Pérez-Montaña F, del Cerro P, Jiménez-Guerrero I et al (2016) RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics* 17:198

CAPÍTULO 4.

Isolation of rhizobial extracellular membrane vesicles from
bacteroids



Isolation of Rhizobial Extracellular Membrane Vesicles from Bacteroids

Paula Ayala-García, Irene Jiménez-Guerrero, Mathias Müsken, Francisco Javier Ollero, José Manuel Borrero-De Acuña, and Francisco Pérez-Montaño

Abstract

Extracellular-membrane vesicles (EMVs) are spherical buds of the extracellular membrane, commonly produced by Gram-negative bacteria, known to mediate intricate inter-kingdom communication. In this context, comprehensive research dissecting the role of EMVs in one of the most complex nature-occurring molecular dialogues, rhizobium-legume symbiosis, has been so far neglected. During the different stages of the symbiotic process, rhizobia and their host plants establish a very specific and controlled intercellular trafficking of signal molecules. Thus, as conveyors of a broad range of molecules into the target cell, EMVs are gaining weight in the field. Here, we describe a detailed protocol to isolate EMVs from bacteroids of legume nodules, opening a new door for discovering new authors of the symbiotic process.

Key words Symbiosis, *rhizobium*, Legume, Bacteroids, Symbiosome, Extracellular membrane vesicles

1 Introduction

Legume plants establish symbiotic interactions with soil-borne bacteria known as rhizobia. In this mutualist relationship, the plant develops specific root organs, termed nodules, where rhizobia convert atmospheric nitrogen to ammonia, a plant-assimilable form of nitrogen. In exchange, legume supplies bacterium with carbon source and a stable and protected environment [1].

A successful symbiotic interaction requires a sophisticated molecular exchange of signals between bacteria and plants. The symbiosis onset occurs when compatible flavonoids exudated by the legume roots are recognized by rhizobia. In response to these flavonoids, bacteria induce the synthesis and secretion of specific molecules, known as Nod factors (NF), which are sensed by appropriate legumes, triggering infection thread (ITs) formation, root cortex cell division, and finally the nodule formation [2–5]. ITs are

tubular structures developed by root hair membrane invagination, through which rhizobia are penetrating until they reach the cortex cells, where bacteria are released into the cytoplasm of the plant cell by endocytosis [6, 7]. At this stage, bacteria undergo a differentiation to bacteroids, where the atmospheric nitrogen fixation takes place. Due to endocytosis, bacteroids are encapsulated by the host membrane conforming the so-called symbiosomes, reason why the space between bacteroid and plant cell membrane is named symbiosome space (SS) [8, 9]. Thus, the SS acts as unobstructed interface for material exchange and signal communication between microsymbionts and host cells [10, 11].

EMVs are spherical, bacterial extracellular membrane-based structures with an approximate diameter of 40–150 nm [12]. In general, EMVs are catalogued as transport vehicles for important biological molecules, including lipids, lipopolysaccharides, enzymes, signaling molecules, toxins, and nucleic acids [13]. The formation of EMVs by Gram-negative bacteria seems to be a universal process, participating these evaginations in processes such as quorum sensing, digestion of nutrients, immunomodulation, horizontal DNA transfer, excretion of misfolded proteins, or toxin delivery [14].

In case of rhizobia, insights into the role of EMVs at initial steps of the symbiotic process are emerging in the past years. Along these lines, two recent proteomic studies of EMVs isolated from *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium fredii* in the presence of their respective nodulation-gene-inducing flavonoids indicate significant differences in protein cargo when comparing with that present in EMVs isolated in the absence of these symbiotic signals [15, 16]. This observation points out the idea that EMVs may be playing a significant role at early stages of the symbiotic process. However, to our knowledge, no reports addressing the characterization of rhizobial EMVs during late stages of symbiosis, i.e., from bacteroids and/or symbiosomes, have been published so far.

In this chapter, we detail a protocol to successfully isolate EMVs from nodule bacteroids, which will open a door to analyze and characterize the EMV cargo by different -omic approaches.

2 Materials

The following protocol is described for the *Rhizobium tropici* CIAT899-*Phaseolus vulgaris* symbiosis, but it could be extended to any other symbiotic partners. This protocol requires standard equipment in microbiology, molecular biology, including autoclave, biological hood, incubators, shakers, refrigerators, –80 °C and –20 °C freezers, spectrophotometer, and centrifuges. In addition, facilities for plant growth as well as routine microbiology and molecular materials and devices are needed. Unless otherwise

specified, prepare all solutions with distilled H₂O, and store all reagents at room temperature. Despite no sterile conditions are required in Subheading 3.4, it is recommended the use of gloves and keep the samples on ice.

2.1 Inoculum Preparation

1. *Rhizobium tropici* CIAT899 strain.
2. Tryptone yeast (TY) medium: dissolve 3 g yeast extract, 5 g tryptone, and 0.65 g of CaCl₂·2H₂O in 1 L of distilled water. Add agar 2% for TY agar plates. Autoclave at 121 °C for 20 min.
3. Yeast mannitol (YM10) liquid medium: dissolve 500 mg K₂HPO₄, 200 mg MgSO₄·7H₂O, 100 mg NaCl, 400 mg yeast extract, and 10 g mannitol in 1 L of distilled water. Adjust pH to 6.8–7 and autoclave at 121 °C for 20 min.
4. Distillated water.
5. Standard Petri dishes.
6. Autoclave.
7. pH meter.
8. Sterile flasks and tubes.

2.2 Plant Inoculation Assay

1. *Phaseolus vulgaris* seeds.
2. 1% Agar-water medium: mix 1 g of agar in 100 mL of distilled water. Autoclave at 121 °C for 20 min.
3. 6% sodium hypochlorite.
4. Sterile distilled water.
5. Perlite.
6. Vermiculite.
7. Ropes.
8. Iron citrate solution: dissolve 5 g of iron citrate in 1 L of distilled water with heat.
9. Gibson solution: dissolve 2.86 g of H₃BO₃, 2.08 g of MnSO₄·H₂O, 0.22 g of ZnSO₄·7H₂O, 0.08 g of CuSO₄·5H₂O, and 0.13 g of Na₂MoO₄ in 1 L of distilled water.
10. Fahraeus nitrogen free solution: dissolve 100 mg CaCl₂·2H₂O, 120 mg MgSO₄·7H₂O, 100 mg KH₂PO₄, 75 mg Na₂HPO₄·2H₂O, 1 mL iron citrate, and 1 mL Gibson solutions in 1 L of distilled water. Adjust pH to 6.5–7.
11. Standard Petri dishes.
12. Container to mix perlite and vermiculite.
13. Autoclave.
14. Sterile glass bottle for sterilizing seeds.
15. 2 L glass container.
16. Bottom-excised glass bottle.

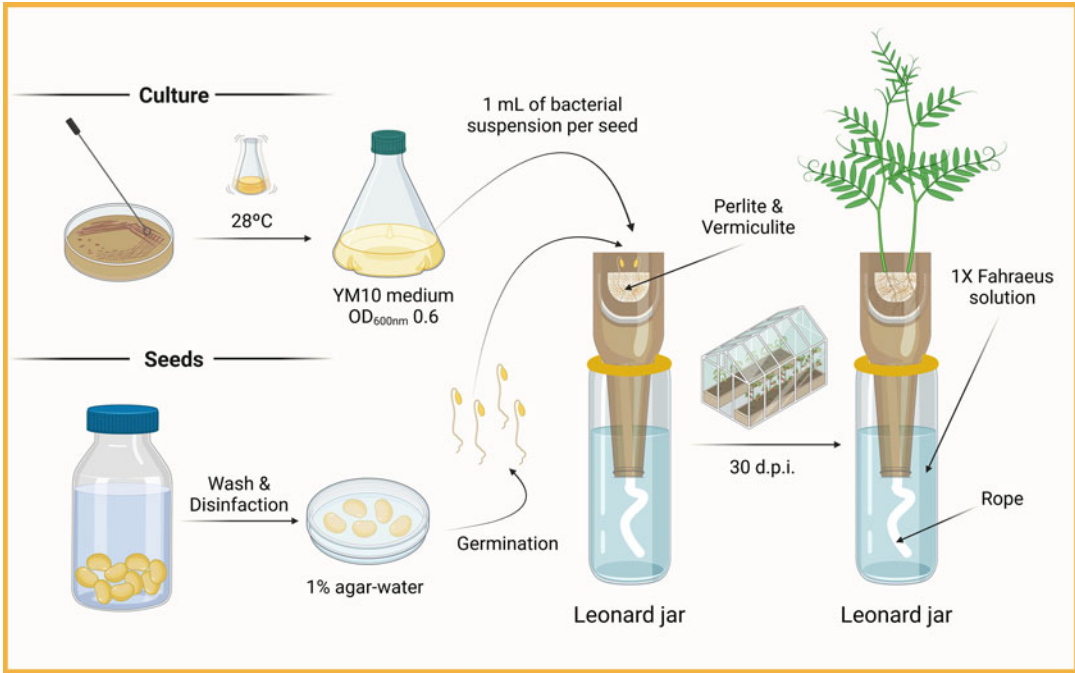


Fig. 1 Schematic view of legumes growth units in nodulation assays, the so-called Leonard jars

17. Leonard jars preparation (Fig. 1):,mix perlite and vermiculite in a proportion 1:3 (*see Note 1*). Wash the vermiculite-perlite mixture 3 times with water. Add 1.5 L of Fahraeus solution 1X in a 2 L glass container. Fill the bottom-excised glass bottle with the vermiculite-perlite mixture and place over the Fahraeus container, both connected by a rope. Autoclave the jars at $121^{\circ}C$ for 20 min. Once cold, cover the Fahraeus container to avoid microbial contamination.

18. Plant growth chamber or greenhouse.

2.3 Nodule EMV Fraction Collection

1. MMS solution: 40 mM 3-(4-morpholino)-propane sulfonic acid, 20 mM KOH, 2 mM $MgSO_4$, and 0.3 M sucrose. Adjust the pH to 7.0 and autoclave at $121^{\circ}C$ for 20 min.
2. Mortar.
3. Pestle.
4. $40\ \mu m$ filter.
5. $0.2\ \mu m$ filter.
6. 10 mL syringes.
7. Centrifuge.
8. 15 mL sterile conical tubes.
9. Centrifuge tubes.
10. Precision balance.

2.4 EMV Isolation and Concentration by Ultracentrifugation

1. Phosphate-Buffered Saline (PBS) 10X: dissolve 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, and 0.245 g KH₂PO₄ in 1 L of distilled water. Autoclave at 121 °C for 20 min.
2. 0.2 µm filter.
3. 10 mL syringe.
4. Centrifuge.
5. Centrifuge tubes.
6. Optima-MAX Beckman Coulter ultracentrifuge.
7. MLA-80 Beckman ultracentrifuge rotor.
8. 8 mL ultracentrifuge tubes appropriate for MLA-80 rotor.

3 Methods

3.1 Culture Preparation

1. Plate *Rhizobium tropici* CIAT899 in TY agar plate and incubate at 28 °C for 48 h.
2. Inoculate a single colony in 5 mL of TY liquid media. Grow at 28 °C with continuous shaking to stationary phase.
3. Add 1 mL from this culture to 20 mL YM10 liquid medium (*see Note 2*) and incubate at 28 °C with continuous shaking until the optical density at 600 nm reaches 0.6 (approximately 10⁹ cells/mL).

3.2 Plant Inoculation Assay

3.2.1 Seed Germination

1. If needed, wash *Phaseolus vulgaris* seeds with sterile distilled water to remove the bactericide cover (*see Notes 3 and 4*).
2. Place seeds in a sterile bottle with 6% sodium hypochlorite solution for 5 min.
3. Wash with sterile distilled water 6 times.
4. Place seeds in 1% agar-water plates and incubate in the dark at 28 °C for 3 days to germinate them (*see Note 5*).

3.2.2 Seed Inoculation and Nodule Harvesting

1. Place 2 sterilized seedlings per Leonard jar (*see Note 6*).
2. Add 1 mL of bacterial suspension per seed (OD_{600nm} 0.6).
3. Place jars in a controlled plant chamber or greenhouse with the following conditions: 16 h/26 °C and light, and 8 h/18 °C dark, with 70% constant humidity.
4. After 30 days post-inoculation (dpi), harvest a total of 100 root nodules from at least 3 different Leonard jars (*see Note 7*).

3.3 Symbiosome Space Collection

1. Grind nodules using mortar and pestle in 10 mL of MMS solution (Fig. 2a, b).
2. Filter the crushed nodule material using 40 µm filters to discard the plant tissues.
3. Centrifuge the eluents at 0.1 × g for 5 min and discard the pellets to remove plant debris.

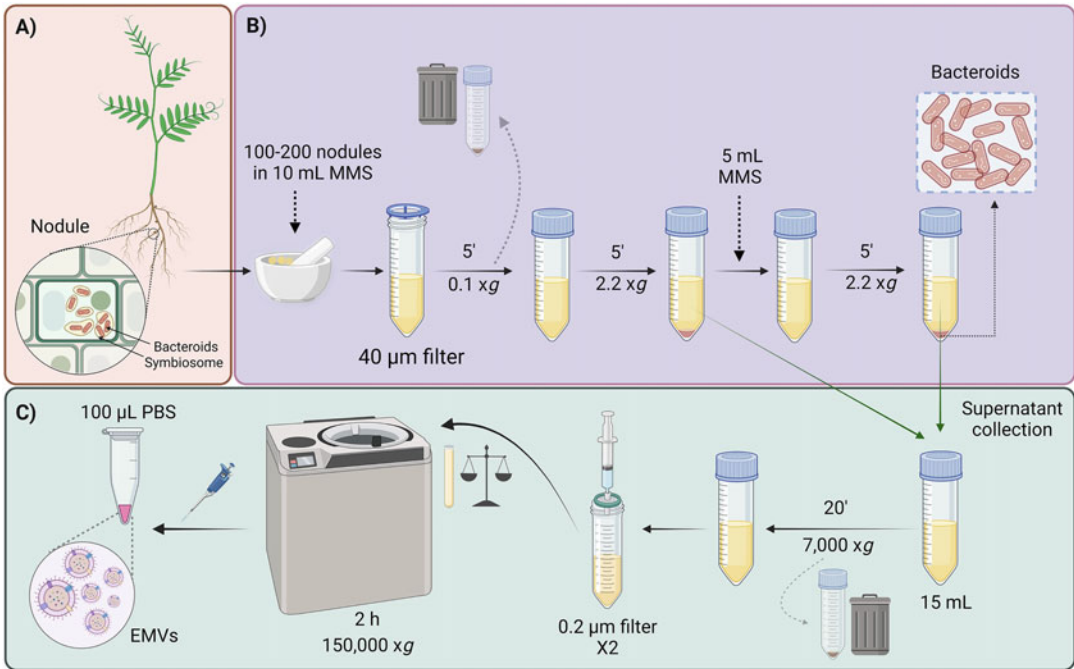


Fig. 2 Workflow described in this chapter for the nodule extracellular membrane vesicles (EMVs) isolation. (a) Legume nodule schematic representation. The symbiosome and bacteroids are indicated by arrows. (b) Nodule EMVs fraction collection. (c) EMVs isolation and concentration by ultracentrifugation

4. Centrifuge the supernatants at $2.2 \times g$ for 5 min.
5. Collect the supernatants in a 15 mL sterile conical tube.
6. Resuspend the pellets from **step 4** in Subheading 3.3 in 5 mL MMS solution.
7. Centrifuge at $2.2 \times g$ for 5 min (*see Note 8*).
8. Add the supernatants to the same tubes of **step 5** in Subheading 3.3 (Fig. 2b).

3.4 Isolation and Concentration of EMVs by Ultracentrifugation

1. Centrifuge tubes containing approximately 5.5 mL of symbiosome space samples at $7000 \times g$ and 4°C for 20 min.
2. Discard the pellets and filter the supernatants using $0.2 \mu\text{m}$ filters.
3. Place the filtered eluents in ultracentrifuge tubes appropriate for Beckman 70.1 Ti Rotor and balance to $10^{-2} \times g$ accuracy.
4. Ultracentrifuge samples at $150,000 \times g$ at 4°C for 2 h (*see Note 9*).
5. Carefully remove completely the supernatant with the help of a microtip.
6. Resuspend the pellet in 100 μL of PBS buffer and store EMVs samples at 4°C (Fig. 2c) (*see Note 10*).

3.5 Integrity and Quantification of EMVs

1. Microscopy for EMVs integrity evaluation, lipid dye, and nanoparticle tracking analysis for EMVs quantification are described in detail in the Chapter 14.

4 Notes

1. Make the perlite-vermiculite mix in a ventilated room and use mask to prevent inhalation of dust from the perlite stock.
2. TY is a rich medium to grow optimally *R. tropici* CIAT899 from $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ stock. However, it presents high salt concentration that might interfere with the plant growth. Thus, YM10 medium is used to prepare the inoculant after growing this bacterium on TY plates from $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.
3. *P. vulgaris* seeds used for this experiment have a red bactericide covert, which is easily removed with water and hand gently rub.
4. Because not all seeds germinate, the number of seeds needed for the experiment should be higher than strictly required.
5. Time required for seed germination is usually 2–3 days.
6. Number of seedlings per Leonard jar depends on the plant and jar size. For small plants such as *Lotus japonicus*, 2–3 seedlings are recommended, while for bigger plants such as *Phaseolus vulgaris*, sow only one seedling.
7. The nodule harvesting time point varies according to the plant growth period and the number of nodules developed by the legume, which in turn depends on the rhizobia-legume partner. *R. tropici* CIAT899-*P. vulgaris* symbiosis provides many nodules (approximately 100 nodules per plant – after 30 dpi).
8. The pellet resulted from this centrifugation corresponds to the bacteroid cells.
9. Before ultracentrifugation, tube weights must be perfectly equalized in a precision balance.
10. EMVs are stable at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ for months.

Acknowledgments

This work was supported by research grants: EMERGIA20_00048 from the Junta de Andalucía, Consejería de transformación económica, industria, conocimiento y universidades, the ProyExcel_00450 from the Junta de Andalucía, Consejería de Universidad, Investigación e Innovación, the PID2021-122395OA-I00 and PID2020-118279RA-I00 from the Spanish Ministry of Science and Innovation.

References

1. Oldroyd GE (2013) Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11:252–263
2. Cooper JE (2007) Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol* 103:1355–1365
3. Ormeño-Orrillo E, Menna P, Almeida LG et al (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
4. Geurts R, Bisseling T (2002) *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell* 14:239–249
5. Janczarek M, Rachwał K, Marzec A et al (2015) Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Appl Soil Ecol* 85:94–113
6. Clúa J, Roda C, Zanetti ME et al (2018) Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes* 9:125
7. Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B et al (2006) Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5230–5235
8. Schneider S, Schintlmeister A, Becana M et al (2019) Sulfate is transported at significant rates through the symbiosome membrane and is crucial for nitrogenase biosynthesis. *Plant Cell Environ* 42:1180–1189
9. Day D, Poole P, Tyerman S et al (2001) Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules. *Cell Mol Life Sci* 58:61–71
10. Luo Y, Liu W, Sun J et al (2022) Quantitative proteomics reveals key pathways in the symbiotic interface and the likely extracellular property of soybean symbiosome. *J Genet Genomics* 50:7–19
11. Haag AF, Arnold MFF, Myka KK et al (2013) Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS Microbiol* 37:364–383
12. Mashburn-Warren LM, Whiteley M (2006) Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol* 61:839–846
13. Jan AT (2017) Extracellular membrane vesicles (EMVs) of Gram-negative bacteria: a perspective update. *Front Microbiol* 8:1053
14. Haurat MF, Elhenawy W, Feldman MF (2015) Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles. *Biol Chem* 396:95–109
15. Taboada H, Dunn MF, Meneses N et al (2019) Qualitative changes in proteins contained in extracellular membrane vesicles produced by *Rhizobium etli* grown in the presence of the nod gene inducer naringenin. *Arch Microbiol* 201:1173–1194
16. Li D, Li Z, Wu J et al (2022) Analysis of extracellular membrane vesicles indicates that glycerophospholipid metabolism contributes to early symbiosis between *Sinorhizobium fredii* HH103 and soybean. *Mol Plant-Microbe Interact* 35:311–322

DISCUSIÓN GENERAL

Las Naciones Unidas estiman que la población mundial aumentará significativamente superando los 9.700 millones de habitantes en el año 2050 (Hunter *et al.*, 2017). Ante este hecho, se plantea la necesidad de asegurar la alimentación de un planeta cada vez más poblado, al mismo tiempo que se debe mantener el equilibrio del medio ambiente. En la actualidad, las prácticas agrícolas extensivas emplean fertilizantes y pesticidas para aumentar la productividad de los cultivos y prevenir pérdidas económicas y de rendimiento. Sin embargo, la aplicación de estas técnicas agrícolas derivan en multitud de efectos nocivos para el medioambiente, como la pérdida de biodiversidad, la contaminación de aguas y suelos, y la intoxicación de la fauna, incluidos los seres humanos (Carvalho, 2006; Tilman *et al.*, 2002).

La simbiosis rizobio-leguminosa es un proceso natural por el que las leguminosas, de gran importancia a nivel nutricional, satisfacen sus necesidades de nitrógeno al establecer una relación mutualista con bacterias presentes en el suelo, los rizobios. Así, esta interacción simbiótica supone una mejora del crecimiento y la productividad de los cultivos de forma natural y sostenible, asegurando la conservación del medio ambiente frente al uso de fertilizantes nitrogenados. Por este motivo entender las bases moleculares de este proceso biológico resulta clave para, potencialmente, poder incrementar su eficiencia (Liu *et al.*, 2011; Soumare *et al.*, 2020; Jiménez-Guerrero *et al.*, 2023).

El éxito de la simbiosis rizobio-leguminosa reside, en primera instancia, en la capacidad de los rizobios de reconocer flavonoides específicos presentes en los exudados de las raíces de la planta, y la posterior activación de la síntesis de los NFs (Mulligan & Long, 1985). Estos NFs son liberados a la rizosfera y posteriormente reconocidos por la planta, dando paso a la entrada de los rizobios en la raíz y al desarrollo de los nódulos, donde las bacterias residen y se diferencian a formas capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Oldroyd, 2013; Weston & Mathesius, 2013). De esta forma, los reguladores NodD de los rizobios, responsables del reconocimiento de los flavonoides presentes en los exudados radiculares y de llevar a cabo la activación transcripcional de los genes *nod* y la síntesis de NFs, asumen un papel crucial en la especificidad rizobio-leguminosa (Mbengue *et al.*, 2020; Shumilina *et al.*, 2023).

La estirpe *R. tropici* CIAT 899, organismo de estudio en esta Tesis Doctoral, es una estirpe rizobiana con capacidad de nodular a un amplio grupo de plantas hospedadoras, entre las que se encuentra *P. vulgaris* (judía), de gran interés en la industria

agroalimentaria. El hecho de ser una estirpe simbióticamente promiscua junto a su capacidad para resistir a diversos tipos de estreses abióticos, convierten a este rizobio en un organismo de gran interés para su estudio (Martínez-Romero *et al.*, 1991; Hungria *et al.*, 2003). CIAT 899 produce una amplia variedad de NFs en presencia de un flavonoide inductor, como puede ser la apigenina. Sin embargo, la característica que distingue a esta estirpe del resto de rizobios es la capacidad de sintetizar NFs bajo condiciones de estrés osmótico, de forma independiente a la presencia de un flavonoide inductor en el medio (Hungria *et al.*, 2000; Estévez *et al.*, 2009; Guasch-Vidal *et al.*, 2013).

A lo largo de los años se ha tratado de investigar la maquinaria que regula la síntesis de NFs en CIAT 899, con el objetivo de entender que mecanismos moleculares y genéticos conducen a la producción de NFs bajo condiciones de estrés osmótico. La secuenciación del genoma de CIAT 899 junto a estudios de mutagénesis y análisis transcriptómicos han permitido realizar grandes avances sobre el modo de regulación de la biosíntesis de los NFs en diferentes condiciones fisiológicas. Se han identificado 5 copias del gen *nodD* en el genoma de CIAT 899 (*nodD1*, *nodD2*, *nodD3*, *nodD4* y *nodD5*): el regulador NodD1 se activa y lleva a cabo la activación de la transcripción de los genes *nod* y síntesis de NFs en presencia del flavonoide apigenina, mientras que NodD2 es esencial para llevar a cabo la síntesis de NFs bajo condiciones de estrés osmótico (Pérez-Montaña *et al.*, 2016; del Cerro *et al.*, 2017, 2019). Además, NodD1 y NodD2 parecen ser los principales reguladores que actúan en la síntesis de NFs, ya que la mutación doble de los genes *nodD1* y *nodD2* suprime la capacidad simbiótica de CIAT 899 para nodular con sus leguminosas hospedadoras *P. vulgaris*, *L. burttii* y *L. japonicus* (del Cerro *et al.*, 2017).

Por otro lado, los datos transcriptómicos publicados muestran que los genes simbióticos que son regulados por diferentes NBs del genoma de CIAT 899 (*nodA1BCSUIJH* [controlado por la *nod* box 1, NB1], *nodA2 hsnT nodFE* [NB2], *nodM* [NB3], *y4wEF* [NB4], y los genes *rtciat899_pb01550* y *rtciat899_pb01545* [NB5]) se activan en presencia del flavonoide apigenina (3,7 μ M) y bajo condiciones de estrés osmótico con niveles de expresión muy similares. Sin embargo, los genes *nodD2* y *rtciat899_pb01075* localizados bajo la NB9, se activan de forma diferencial únicamente en presencia de estrés salino (NaCl 300 mM) o estrés por manitol (400 mM) (Pérez-Montano *et al.*, 2016; del Cerro, 2019).

Inicialmente, se pensaba que las vías de activación de los genes *nod* en presencia del flavonoide apigenina y bajo un estrés osmótico eran totalmente independientes, ya que la ausencia de NodD1 no afecta a la síntesis de NFs en condiciones de estrés osmótico y la inactivación de NodD2 no afecta a la síntesis de NFs ante la presencia del flavonoide apigenina (del Cerro *et al.*, 2017). Sin embargo, los estudios más recientes demuestran que esto no es exactamente así, ya que los análisis transcriptómicos realizados en un mutante de CIAT 899 en el gen *nodD1* en condiciones de estrés osmótico indican que los niveles de expresión de los genes *nodD2* y *rtciat899_pb01075* no alcanzan los valores de activación a los mismos niveles que la estirpe silvestre, sugiriendo que NodD1 podría estar implicado en potenciar la expresión transcripcional de los genes *nod* en condiciones de estrés osmótico (del Cerro *et al.*, 2017). Además, aunque está bien establecido el papel esencial de la proteína NodD2 en la síntesis de NFs bajo condiciones de estrés osmótico en CIAT 899, nada se sabe acerca de la función del otro gen, que al igual que *nodD2*, se activa transcripcionalmente solo en presencia de estrés osmótico y no con apigenina en el medio. Este gen, *rtciat899_pb01075*, codifica para un factor de transcripción de la familia AraC y se localiza aguas debajo del gen *nodD2* y la NB9.

El primer capítulo de esta Tesis Doctoral se centra en el estudio del gen *rtciat899_pb01075*, al que se designó con el nombre de *onfD*, de sus siglas en inglés *Osmotic Nod Factor regulator*. En este capítulo se demuestra que OnfD es esencial en la síntesis de NFs bajo condiciones de estrés osmótico y que junto a NodD2, actúa en la activación de los genes simbióticos. Así, los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que la pérdida de OnfD afecta, del mismo modo que la ausencia del regulador NodD2, a las capacidades simbióticas de CIAT 899 (del Cerro *et al.*, 2017). De hecho, un mutante en el gen *onfD* muestra el mismo fenotipo que un mutante *nodD2*, tanto a nivel de expresión de los genes de nodulación en las diferentes condiciones inductoras, como a la hora de establecer simbiosis con sus plantas hospedadora.

De esta forma, los ensayos de actividad β -galactosidasa realizados en un mutante del gen *onfD*, demuestran que los genes *nodA1* y *nodA2* de CIAT 899 (directamente implicados en la formación del núcleo principal de los NFs) no se activan ni en condiciones de estrés osmótico iónico (NaCl 300 mM) ni bajo un estrés osmótico de tipo no iónico (manitol 400 mM). Resultados que confirman que el regulador OnfD es esencial para la expresión de ambos genes *nodA* ante condiciones de estrés osmótico. Sin embargo, de la misma forma que ocurre en el mutante del gen *nodD2*, la ausencia de OnfD no afecta a la

expresión de los genes *nodA1* y *nodA2* en presencia de apigenina (3,7 μ M) (**Capítulo 1: Figura 2B**). Estos resultados se correlacionan con el hecho de que en un mutante *onfD* crecido en condiciones de estrés osmótico no se detecten moléculas de NFs mediante TLC (**Capítulo 1: Figura 2C**). Respecto a los estudios de ARN-seq, estos confirman que la pérdida del regulador OnfD conlleva la activación transcripcional de los genes simbióticos en presencia de apigenina, pero no bajo condiciones de estrés osmótico (**Capítulo 1: Tabla 2**). De esta forma, se confirma que, al igual que NodD2, el regulador OnfD es determinante en la síntesis y secreción de NFs en CIAT 899 en condiciones de estrés osmótico, ya sea por NaCl o por manitol.

Respecto a la capacidad de establecer simbiosis con sus plantas hospedadoras, el regulador OnfD parece ser crucial para nodular de forma eficiente con su hospedador por excelencia, *P. vulgaris*. No obstante, la mutación del gen *onfD* no afecta al desarrollo de los nódulos en las plantas de *L. burtii* y *L. japonicus* (**Capítulo 1: Figura 4A**). Este fenotipo simbiótico es idéntico al que se observa en un mutante del gen *nodD2*. Además, el hecho de que las plantas de judía colonizadas con un mutante *onfD* presenten una disminución significativa en el número de nódulos con respecto a las plantas colonizadas por la estirpe silvestre podría ser consecuencia del retraso en la formación de los nódulos que se observa en las plantas inoculadas con el mutante *onfD* (**Capítulo 1: Figura 4B**). Sin embargo, los ensayos de competitividad por la nodulación entre la estirpe mutante *onfD* y CIAT 899 muestran que los niveles de ocupación de los nódulos de judía son muy similares cuando se co-inoculan ambas cepas, lo que podría deberse a que los NFs producidos por la estirpe silvestres este complementando la falta de los NFs del mutante (**Capítulo 1: Figura 4C**). Cabe mencionar que la ausencia conjunta de los reguladores NodD1 y OnfD, al igual que ocurre en un doble mutante *nodD1nodD2*, implica la pérdida total de la capacidad de CIAT 899 de establecer simbiosis con sus plantas hospedadoras *P. vulgaris*, *L. burtii* y *L. japonicus*, reforzando el papel crucial que juegan la proteína NodD1 y el par NodD2-OnfD (**Capítulo 1: Figura 4A**).

Con el fin de conocer los mecanismos moleculares subyacentes a la activación de los genes de nodulación mediados por NodD1, NodD2 y OnfD, se llevaron a cabo estudios de interacción proteína-proteína entre los diferentes reguladores transcripcionales. Así, estudios de doble híbrido en bacterias revelaron que las proteínas NodD1, NodD2 y OnfD presentan la capacidad de establecer homodímeros, lo que era esperable, pues se trata de una característica común a ambas familias de reguladores, LysR y AraC (Maddocks &

Oyston., 2008; Yang *et al.*, 2011). Sin embargo, el dato más revelador obtenido a partir de estos experimentos es la posible interacción entre los reguladores OnfD y NodD2, lo que sugiere la formación de un complejo heterodimérico en la activación de los genes simbióticos de CIAT 899 (**Capítulo 1: Figura 5**).

En definitiva, todos estos resultados indican que las proteínas OnfD y NodD2 son indispensable para la síntesis y secreción de NFs en condiciones de estrés osmótico, y que ambos reguladores interaccionarían actuando conjuntamente en este proceso. Además, se pone de manifiesto que los NFs sintetizados bajo estrés osmótico son importantes en el establecimiento de la simbiosis *P. vulgaris*-CIAT 899. Estos hallazgos, junto a las secuencias de reconocimiento de los activadores/represores transcripcionales de tipo AraC que se han identificado en la región promotora del gen *onfD* (**Capítulo 1: Figura 1C**) han permitido generar un modelo hipotético de actuación de las proteínas NodD2 y OnfD en la activación de los genes simbióticos (**Figura 13**). En este modelo, cuando CIAT 899 no está sometido a un estrés osmótico en el medio, el homodímero OnfD se mantiene ocupando los sitios operadores *onfI1* y *onfO2*. Este estado oligomérico de la proteína favorece la formación de un *loop* o lazo en el ADN que impide el acceso de la ARN polimerasa a las regiones promotoras de ambos genes, bloqueando así la transcripción simultánea de los genes *nodD2* y *onfD*.

¿Qué ocurriría en CIAT 899 ante una condición de estrés osmótico como NaCl 300 mM? Como mecanismo de respuesta a este tipo de estrés en el medio, se sabe que ciertas bacterias acumulan osmolitos compatibles en su citoplasma. Estos osmolitos pueden ser azúcares (como la sucralosa, la maltosa, la celobiosa, la turanosa, la gentiobiosa o la palatinosa), aminoácidos (principalmente glutamato, glicina y prolina), iminoácidos (ácido pipercolico), ectoínas, beatinas, estaquidrina, *N*-acetilglutamato glutamina o dimetilsulfoniopropionato (Vriezen *et al.*, 2010). En el caso de CIAT 899, se ha demostrado que acumula, al menos, trehalosa, manitol y glutamato en su citoplasma al exponerse a elevadas concentraciones de sal (Fernández-Aunión *et al.*, 2010). Así, ante un aumento de la concentración de NaCl extracelular, se produciría la acumulación de osmolitos compatibles en el citoplasma de CIAT 899, que actuarían como ligando de unión a OnfD. De esta forma, el reconocimiento del ligando por parte de OnfD generaría un cambio conformacional del regulador, que pasaría a ocupar las posiciones inductoras *onfI1* y *onfI2*. Este hecho facilitaría la disipación del *loop* en el ADN y el reclutamiento de la ARN polimerasa, teniendo lugar la expresión de los genes *nodD2* y *onfD*. El

aumento citoplasmático de las proteínas NodD2 y OnfD favorecería la formación de heterodímeros entre ambos reguladores, que actuarían uniéndose a las diferentes NBs del genoma de CIAT 899 para llevar a cabo la activación transcripcional de los genes *nod* y a la síntesis de NFs. Por último, el regulador NodD1 podría ayudar al reclutamiento inicial de la ARN polimerasa mediante su unión a la NB9, lo que explicaría el papel parcial que juega esta proteína potenciando la transcripción de los genes *nodD2* y *onfD* bajo condiciones de estrés osmótico (**Capítulo 1: Tabla 1**).

Los reguladores de tipo AraC han sido ampliamente estudiados en bacterias ya que están implicados en la regulación de una gran variedad de procesos biológicos, como en el

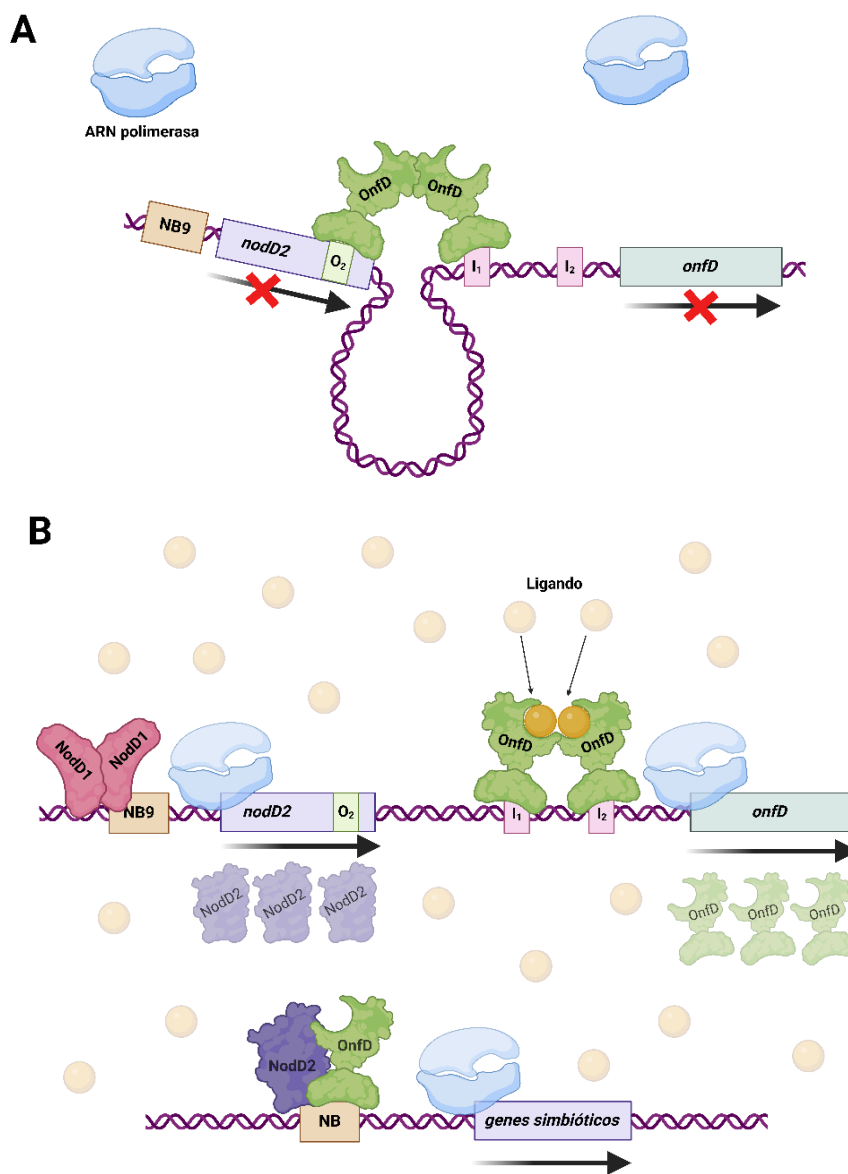


Figura 13. Modelo de regulación de los genes *nodD2* y *onfD* de *R. tropici* CIAT 899 en ausencia (**A**) y presencia (**B**) de un estrés osmótico en el medio.

metabolismo del carbono, en la activación de los sistemas de secreción, en virulencia o en la respuesta a diferentes estreses abióticos (Yang *et al.*, 2011; Journet *et al.*, 2016; Mukaihara *et al.*, 2004; Lipscomb *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015). Aunque muchos reguladores de tipo AraC se han descrito en rizobios, como por ejemplo los reguladores CuxR y RhrA de *S. meliloti* 2011 (Schaper *et al.*, 2017; Bringhurst & Gage, 2000; Lynch *et al.*, 2001) o el regulador CadR de *Bradyrhizobium* sp. HW13 (Kitagawa *et al.*, 2002), hasta la publicación de los datos recogidos en este capítulo no se había demostrado la implicación directa de esta familia de reguladores en simbiosis. De hecho, hasta la fecha, solo existe un trabajo que hace referencia a un regulador de la familia AraC y su posible implicación en la interacción rizobio-leguminosa. Se trata del regulador codificado por el gen *orf816* de *Rhizobium* sp. BR816. Este gen se sitúa aguas abajo del gen *nodD3* en el genoma de la estirpe BR816 y se comprobó que cuando ambos genes se expresan de forma heteróloga en un mutante de *S. fredii* NGR234 en el gen *nodD1* se restaura la habilidad de este rizobio para nodular con sus plantas hospedadoras a niveles superiores de lo que resulta de la complementación única del gen *nodD3* de *Rhizobium* sp. BR816 (Vlassak *et al.*, 1998). Curiosamente, los análisis filogenéticos llevados a cabo en esta Tesis Doctoral, basados en la comparación de las secuencias de los reguladores AraC de diferentes rizobios, sitúan al regulador OnfD de CIAT 899 y al producto del gen *orf816* de *Rhizobium* sp. BR816 muy próximos en el árbol, lo que sugiere que ambas proteínas podrían tener mecanismos de acción similares (**Capítulo 1: Figura 1A**).

Además, estudios de comparaciones de secuencias revelaron la presencia de proteínas en otros rizobios con un porcentaje de identidad muy similar al regulador OnfD de CIAT 899. De este modo, la proteína OnfD presenta una secuencia de aminoácidos idéntica a los reguladores AraC encontrados en los diferentes plásmidos simbióticos de *R. freirei* PRF 81 (ENN88367.1) y de las estirpes CCGE531 (AYG70418.1), CCGE532 (AYG76959.1) y SEMIA 4088 (WP_004112928.1) de *Rhizobium* sp. En menor proporción, OnfD comparte un porcentaje de identidad del 94% con la proteína reguladora AraC de *Rhizobium* sp. NXC24 (AVA24063.1), un 81% de identidad con el regulador de *R. jaguaris* CCGE525 (AYG64285.1) y un 70% con un regulador AraC localizado en el genoma de *R. grahamii* CCGM3 (RDJ02018.1). Estos datos indican que el regulador OnfD de tipo AraC está conservado en diferentes rizobios, lo que apoya el posible papel de estos reguladores en la simbiosis entre ciertos rizobios y sus leguminosas hospedadoras. Finalmente, en el genoma de CIAT 899 se han encontrado hasta 21

reguladores de tipo AraC, tres de ellos localizados en el plásmido simbiótico junto a *onfD*. Por ello, no se puede descartar la implicación de estos reguladores de tipo AraC en la simbiosis entre CIAT 899 y sus plantas hospedadoras (Ormeño-Orrillo *et al.*, 2012).

Los hallazgos descritos en el primer capítulo de esta Tesis Doctoral han supuesto un gran avance en el entendimiento del mecanismo regulador y molecular que lleva a la síntesis de NFs en condiciones de estrés osmótico en CIAT 899, pero ¿qué sentido biológico se puede atribuir a que un aumento de osmolaridad lleve a este rizobio a sintetizar NFs? ¿en qué fase del proceso simbiótico se genera una condición que simule al estrés osmótico en el medio?

El mantenimiento de un balance osmótico en el espacio peribacteroideo es crítico para una eficiente fijación de N₂ en los nódulos. Así, se ha demostrado que las plantas de *L. japonicus* acumulan polialcoholes como manitol, pinitol, ononitol, treitol y sorbitol en las células simbióticas que albergan los bacteroides (Colebatch *et al.*, 2004; Desbrosses *et al.*, 2005). En esta planta, alguno de estos polialcoholes, como el pinitol, son transportados activamente a través de la membrana del simbiosoma hacia el espacio peribacteroideo a través del transportador LjPLT119, cuya mutación resulta en la producción de bacteroides aberrantes con una disminución en la capacidad de fijar N₂ atmosférico (Tian *et al.*, 2022). Teniendo esto en cuenta, los reguladores NodD2 y OnfD de CIAT 899 podrían desempeñar su función en los nódulos ante el aumento de osmolaridad que se genera en el espacio peribacteroideo. Es más, los estudios de ARN-seq llevados a cabo en CIAT 899 en trabajos anteriores revelaron que los genes de fijación de nitrógeno, como ciertos genes *nif* y *fix*, se activan ante un estrés osmótico por manitol (del Cerro *et al.*, 2019). Estos datos respaldarían la teoría de que el estrés por manitol pueda simular en parte las condiciones que se establecen en el interior de los nódulos.

Ante esta teoría, surgen nuevas cuestiones como por ejemplo ¿Qué sentido tendría la síntesis de NFs en el interior de los nódulos? ¿Actuará NodD2 y OnfD en el desarrollo de los tubos de infección? ¿y en la rizosfera? Para dar respuesta a estas preguntas se requiere seguir avanzando en el estudio de estos reguladores, así como en el resto de los reguladores NodD. Sin embargo, CIAT 899, que presenta 5 copias diferentes del gen *nodD*, supone un reto para el estudio de cada uno de estos reguladores, pues el efecto resultante de la omisión de un gen *nodD* podría ser complementado por la acción del resto de las proteínas NodD funcionales (van Rhijn *et al.*, 1993; del Cerro *et al.*, 2015b).

El capítulo dos de la presente Tesis Doctoral está dedicado al estudio de cada uno de los reguladores NodD presentes en CIAT 899 sin la influencia del resto de proteínas NodD. Para ello, se utilizó un fondo mutante de los cinco genes *nodD* de CIAT 899, en el que se complementó cada uno de los genes *nodD* de forma individual. Dicha complementación se llevó a cabo de forma que se pudiera estudiar el efecto de la presencia única de cada gen *nodD* bajo su propio promotor, así como el efecto que resulta de la expresión constitutiva de cada uno de estos genes presentes en un elevado número de copias.

De esta forma, los estudios de expresión de los genes *nod* mediante ensayos de qRT-PCR y de actividad β -galactosidasa demostraron, sorprendentemente, que la expresión constitutiva del gen *nodD2* de CIAT 899 conlleva a la activación transcripcional de los genes *nod* en ausencia de un inductor en el medio (**Capítulo 2: Figura 1**). Así, se demuestra que la activación de los genes *nod* dependiente de NodD2 observada en trabajos previos a esta Tesis (del Cerro *et al.*, 2017 y 2019) se debe a un aumento de la expresión del gen *nodD2* bajo una condición de estrés osmótico, y no a la activación de este regulador por la presencia de un inductor en el medio. Estos resultados coinciden con el modelo hipotético de actuación de los reguladores NodD2 y OnfD que se describió anteriormente (**Figura 13**).

En línea con estos resultados, el alineamiento de secuencia de aminoácidos de los 5 reguladores NodD de CIAT 899 revelaron que el regulador NodD2 está menos conservado que el resto de las proteínas NodD. Mientras que las comparaciones de secuencias entre los pares NodD1-NodD3, NodD1-NodD4, NodD1-NodD5, NodD3-NodD4, NodD3-NodD5 y NodD4-NodD5 muestran porcentajes de similitud que varían desde 67,08% a 77,78%, estos porcentajes se mantienen en un rango entre el 54,81% y el 61,38% al comparar NodD2 con el resto de los reguladores NodD (**Capítulo 2: Figura suplementaria 5A**).

Por otro lado, en el regulador NodD1 se localizan tres dominios predictivos de unión a ligando, que corresponden a las posiciones L¹³³-R¹⁴³, D¹⁵⁴-R¹⁶³ y A¹⁹⁸-I²⁰⁸. Se pudo comprobar que estas secuencias de aminoácidos están menos conservadas en el regulador NodD2 que en el resto de los reguladores NodD de CIAT 899. En concreto, en la misma posición del dominio A¹⁹⁸-I²⁰⁸ en el que NodD1 porta una arginina (de carga positiva) y NodD2 presenta una glutamina (de carga polar neutra) (**Capítulo 2: Figura suplementaria 5B**). De hecho, en el caso del regulador NodD1 de *S. meliloti*, la mutación

por sustitución de una lisina (de carga positiva) por una asparagina (neutra) en el sitio de predicción de unión a flavonoides derivó en la activación constitutiva de la proteína NodD1 (Peck *et al.*, 2013). Curiosamente, los reguladores NodD2 de *M. loti* R7A y *R. leguminosarum* bv. *trifolii* difieren en los sitios de unión a ligando con sus respectivos reguladores NodD1, que se activan en presencia de un flavonoide inductor (Kelly *et al.*, 2018; Ferguson *et al.*, 2020). De la misma manera que en CIAT 899, la inducción de los genes *nod* en la estirpe R7A de *M. loti* está preferentemente controlada por NodD1 y NodD2 en etapas específicas de la infección simbiótica: NodD2 es responsable de la inducción de estos genes en la rizosfera y dentro de los nódulos, mientras que NodD1 es el principal responsable de la inducción de los genes *nod* dentro de los tubos de infección de los pelos radicales. Ambos mutantes son significativamente menos competitivos para nodular que la estirpe silvestre, lo que indica que ambas proteínas son necesarias para una infección simbiótica competente. Además, estos resultados sugieren una activación preferencial de NodD1 y NodD2 por diferentes compuestos inductores producidos en etapas definidas de la infección simbiótica (Kelly *et al.*, 2018). Por su parte, en la estirpe TA1 de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* se ha comprobado que existe una copia de NodD2 funcional que mejoraba la competitividad por la nodulación. Sin embargo, NodD1 mostró una capacidad significativamente mayor para inducir la expresión de genes *nod* y la formación de tubos de infección (Ferguson *et al.*, 2020). Así, las diferencias en los sitios predictivos de unión a ligando entre los reguladores NodD1 y NodD2 de CIAT 899, así como los resultados descritos para otras estirpes de rizobios, podrían explicar las diferentes vías de activación de estos reguladores y su posible implicación en diferentes estadios simbióticos.

En cuanto a los ensayos del fenotipo simbiótico de cada una de las estirpes de CIAT 899 que portan de forma independiente los diferentes genes *nodD*, se pudo observar que la presencia única del gen *nodD1*, ya sea en bajo o alto número de copias, es suficiente para que se establezca una simbiosis efectiva con *P. vulgaris* y *L. burtii*. Sin embargo, la variación de carga citoplasmática de NodD2 sí que afecta a la formación de nódulos en estas dos plantas, ya que solo cuando se sobreexpresa el gen *nodD2* se restaura el número de nódulos al mismo nivel que la estirpe silvestre, mientras que la complementación del gen *nodD2* en bajo número de copias conduce a una reducción en la formación de nódulos en judía y *L. burtii* (**Capítulo 2: Figura 2A**). Este resultado indica que alguna de las proteínas NodD ausentes puedan ser las responsables de potenciar la expresión del gen

nodD2 en la estirpe silvestre y por tanto, cuando *nodD2* se encuentra regulado bajo su propio promotor en ausencia del resto de NodD no se alcanzan los valores de expresión suficientes para restaurar el fenotipo simbiótico.

En *L. japonicus* el escenario simbiótico parece ser diferente. En esta planta, la estirpe que sobreexpresa el gen *nodD2* induce un número de nódulos al mismo nivel que la estirpe silvestre. Sin embargo, esta sobreexpresión no restaura completamente los valores de masa seca de la parte aérea, lo que indicaría que altos niveles del regulador NodD2 potencian la entrada del rizobio y el desarrollo de los nódulos, pero no es suficiente para restaurar por completo la fijación de N₂ en *L. japonicus* (**Capítulo 2: Figura suplementaria 3**). En el caso de *nodD1*, ninguna de las cepas que portan este gen de forma independiente, ya sea en bajo o elevado número de copias, es capaz de nodular de forma eficiente. Teniendo en cuenta que un mutante simple de CIAT 899 en el gen *nodD1* no nodula en plantas de *L. japonicus* (del Cerro *et al.*, 2017), se puede concluir que NodD1 es esencial y a su vez depende de otro u otros reguladores NodD para establecer simbiosis con *L. japonicus*.

Los resultados anteriores indican que el regulador NodD2 de CIAT 899 es importante en todos los estadios simbióticos: en la rizosfera, durante la colonización de la raíz y en el desarrollo de los nódulos de sus plantas hospedadoras *L. burttii*, *L. japonicus* y *P. vulgaris*. Es más, la importancia de NodD2 y su independencia respecto a moléculas inductoras en todos los estadios de la simbiosis se confirma cuando se sobreexpresa el gen *nodD2* de CIAT 899 en la estirpe HH103 de *S. fredii*. Esta sobreexpresión heteróloga del gen *nodD2* promueve la formación de nódulos no fijadores en judía, planta con la que naturalmente HH103 es incapaz de nodular. Además, HH103 con el gen *nodD2* de CIAT 899 sobreexpresado es capaz de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en *L. japonicus*, planta en la que la estirpe silvestre solo es capaz de formar nódulos no fijadores sin bacterias en su interior (Acosta-Jurado *et al.*, 2019). Del mismo modo, la expresión heteróloga en *L. burttii* causa un aumento en el número de nódulos fijadores a niveles superiores que la estirpe silvestre de HH103 (**Capítulo 2: Figura 3**). Sin embargo, pese a la espectacularidad de estos hallazgos, una cuestión importante que queda por dilucidar es entender cómo el regulador NodD2 de CIAT 899 es capaz de tener un efecto en HH103 sin necesitar la acción del regulador OnfD, ya que como se ha demostrado previamente, ambos reguladores son esenciales y actúan de forma conjunta en CIAT 899. Curiosamente, en *S. fredii* HH103 encontramos una proteína, codificada por el gen

SFHH103_06433, que presenta una similitud del 64% con el regulador OnfD de CIAT 899, por lo que podría actuar de manera similar que OnfD.

Por otro lado, los ensayos de colonización e infección de la raíz llevados a cabo en *L. burttii* y *L. japonicus* mediante microscopía confocal han permitido conocer más sobre el modo de entrada de CIAT 899 en estas plantas. Hasta la fecha se conocen diferentes modos de colonización e infección de la raíz por los rizobios. El modo de infección mejor estudiado y más sofisticado por el que los rizobios colonizan e infectan las raíces de sus plantas hospedadoras es a través de la formación de ITs hasta alcanzar las células del córtex radicular, donde las bacterias se liberan. Esta forma de infección es dependiente de NFs y está asociada a altos niveles de compatibilidad entre la bacteria y la planta. *L. japonicus* y *M. truncatula* así como otras leguminosas de interés agronómico como *G. max* (soja) o *P. vulgaris* son algunos ejemplos en los que se han identificado este modo de infección (Acosta-Jurado *et al.*, 2019; Rodríguez-López *et al.*, 2019; Montiel *et al.*, 2021). Además de la entrada por ITs, se conoce otro modo de infección menos evolucionado, denominado infección intracelular. Esta vía consiste en la entrada de los rizobios a través de las roturas que se generan por el desarrollo de las raíces laterales que emergen (denominado en inglés *crack entry*) o bien porque los rizobios logran penetrar a través de las células de la epidermis radicular. Una vez dentro, las bacterias avanzan y se desarrollan entre las células de la epidermis hasta alcanzar las células del córtex (González-Sama *et al.*, 2004; Goormachtig *et al.*, 2004; Sprent, 2007).

Los ensayos de microscopía realizados indican que CIAT 899 coloniza las raíces de *L. burttii* mediante el desarrollo de ITs así como por la vía de infección de tipo intercelular. Es más, los resultados indican que la vía intercelular es predominante, ya que en solo 5 de las 20 plantas de *L. burttii* inoculadas con CIAT 899 silvestre se pudo observar la presencia de ITs, a pesar de que todas ellas presentaban nódulos colonizados (**Capítulo 2: Figura 2D**). Previamente, se había descrito la posibilidad de ambos tipos de infección en esta planta, puesto que *M. loti* penetra mediante la formación de ITs y la estirpe HH103 de *S. fredii* lo hace por la vía intercelular (Kelly *et al.*, 2018; Acosta-Jurado *et al.*, 2016; Acosta-Jurado *et al.*, 2019; Jiménez- Guerrero *et al.*, 2020). Por ello, no solo no es sorprendente que CIAT 899 haya evolucionado desarrollando ambos tipos de infección para colonizar las raíces de *L. burttii*, sino que este escenario es ideal para estudiar qué proteínas NodD pueden estar implicadas en un modo u otro de colonización. Además, el regulador NodD1 de CIAT 899 parece ser esencial para la formación de ITs en las raíces

de *L. burttii*, pues un mutante en este gen forma nódulos colonizados, pero no promueve la formación de ITs (**Capítulo 2: Figura 2D**). Este hecho podría explicar por qué este mutante reduce de forma significativa la formación nódulos en *L. burttii*, ya que se estaría suprimiendo una de las vías de entrada a la raíz (del Cerro *et al.*, 2015a). Por otra parte, la sobreexpresión del gen *nodD2* en el quintuple mutante induce la formación de ITs en *L. burttii*, datos que concuerdan con el aumento del número de nódulos observados en los ensayos de nodulación (**Capítulo 2: Figura 2B, D**). Por último, en plantas de *L. japonicus* no se pudo identificar la formación de ITs en ninguna de las plantas inoculadas con la estirpe silvestre, ni tampoco con el resto de las estirpes mutantes (**Capítulo 2: Figura 2E**), concluyendo que la forma por la que CIAT 899 infecta a esta planta es únicamente mediante la vía intercelular.

Respecto al resto de proteínas NodD, estudios previos basados en mutantes simples de los genes *nodD3*, *nodD4* y *nodD5* de CIAT 899 mostraron que la ausencia de estos reguladores no supone ninguna gran desventaja a la hora de establecer simbiosis con sus plantas hospedadoras *P. vulgaris* y *L. burttii* (del Cerro *et al.*, 2015b). Sin embargo, los mutantes en los genes *nodD3* y *nodD5* disminuyeron ligera pero significativamente el número de nódulos, así como el peso seco de la parte aérea en plantas de *L. japonicus* (del Cerro *et al.*, 2015b). En estas investigaciones iniciales, probablemente la presencia del resto de proteínas NodD dificultase el estudio del papel de estos reguladores transcripcionales de manera individual. Sin embargo, a pesar de que en el presente estudio cada regulador NodD se encuentra en un escenario óptimo para su estudio, es decir, sin la influencia del resto de proteínas NodD, sigue sin concretarse el papel individual que juegan NodD3 y NodD5 en la simbiosis entre CIAT 899 y las diferentes plantas hospedadoras ensayadas. Únicamente, en el caso de NodD4, cuando se sobreexpresa en ausencia del resto de reguladores NodD, se detecta cierta actividad en la expresión de los genes *nod* en los ensayos de actividad β -galactosidasa en presencia de apigenina. Curiosamente, esta misma estirpe sí que es capaz de inducir la formación de un escaso número de nódulos fijadores de nitrógeno en *L. burttii* (**Capítulo 2: Figura 2B**). Estos resultados indican que NodD4 podría reconocer flavonoides específicos en el medio e inducir ligeramente la expresión de los genes *nod* y la síntesis de NFs. En el caso de las proteínas NodD3 y NodD5, no se puede descartar que desempeñen un papel en simbiosis, ya que las condiciones inductoras (estrés osmótico y apigenina) y las plantas que se emplean en estos estudios podrían no ser las adecuadas para desvelar sus funciones.

Además, no es descartable que la función ejercida por estas proteínas NodD requiera de la presencia de alguna de las proteínas NodD restantes, por lo que los ensayos presentados en este capítulo no serían los idóneos para identificar su posible papel durante el proceso simbiótico.

Como ya se ha mencionado, las proteínas NodD son uno de los elementos clave en la especificidad planta-microorganismo en la simbiosis. Sin embargo, esta compatibilidad está a menudo limitada a la capacidad de estas proteínas de reconocer solo ciertos flavonoides (Walker *et al.*, 2020). Debido a ello, a lo largo de los años numerosos estudios se han centrado en tratar de reducir la especificidad de las interacciones simbióticas con el fin de encontrar elementos claves que permitan modificar el rango de hospedador de un rizobio, ya que incrementar la compatibilidad entre los rizobios y las plantas leguminosas pueden tener beneficios muy importantes en agricultura (Jiménez-Guerrero *et al.*, 2020). Así, se han realizado mutaciones específicas o sustituciones de ciertos aminoácidos en los reguladores NodD para determinar si se produce una activación constitutiva de estas proteínas y por consiguiente la expresión constitutiva de los genes *nod* y la síntesis de NFs. Estas mutaciones se conocen con el nombre de FITAs, del inglés *Flavonoid-Independent Transcriptional Activation* (McIver *et al.*, 1989; Vinardell *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2009; Peck *et al.*, 2013). La importancia del trabajo recogido en el segundo capítulo de esta Tesis Doctoral estriba en el hallazgo de que la simple sobreexpresión del gen *nodD2*, sin requerir de ninguna molécula inductora, es capaz de activar constitutivamente la expresión de los genes *nod* y la síntesis de NFs en CIAT 899. Además, la expresión heteróloga de este regulador en otro rizobio, *S. fredii* HH103, no solo mejora la eficiencia de la simbiosis con *L. burttii*, si no que permite ampliar su rango de hospedador, como en el caso de *L. japonicus*, e incluso inducir la formación de nódulos en plantas no compatibles, como *P. vulgaris*.

También, cabe mencionar que el hecho de que la actividad de la proteína NodD2 de CIAT 899 dependa de sus niveles transcripcionales y no de la activación del regulador por acción de una molécula inductora, como sí ocurre en el caso del regulador NodD1, supone una ventaja para poder estudiar en qué punto de la simbiosis es clave su actuación. De este modo, una de las perspectivas futuras sería realizar estudios de ARN-seq en los nódulos de sus plantas hospedadoras, así como en las raíces para confirmar la función de NodD2 en otros estadios simbióticos.

A pesar de que la simbiosis rizobio-leguminosa se ha estudiado ampliamente a lo largo de la historia, aún nos encontramos muy lejos de conocer todos los elementos que participan en el éxito de esta interacción planta-microorganismo. Hasta la fecha, siguen aflorando nuevos factores determinantes o que influyen de cierta forma en el establecimiento de la simbiosis. En este contexto, se sitúan las vesículas de membrana (MVs) liberadas por los rizobios.

Estas nanoesferas lipídicas se han estudiado ampliamente en las dos últimas décadas, siendo abundantes los estudios destinados a las MVs liberadas por organismos patógenos, ya que se ha demostrado que asumen un papel crucial a la hora de modelar la respuesta fisiológica de las células hospedadoras (Li *et al.*, 2016; Sartorio *et al.*, 2021). Más recientemente, ha cobrado protagonismo el estudio de las MVs en la interacción planta-patógeno, lo que ha permitido conocer que las vesículas liberadas por patógenos de plantas portan toxinas, así como de elicitores inmunogénicos que parecen ser claves en el proceso de infección del hospedador (Chowdhury & Jagannadham, 2013; Villageliu & Samuelson, 2022). Sin embargo, poco o nada se sabe acerca del papel de las vesículas liberadas por los rizobios y su implicación en el establecimiento de la simbiosis con las leguminosas. No obstante, es de presuponer que debido a que el proceso simbiótico requiere de un continuo y coordinado intercambio de señales entre ambos organismos, las MVs liberadas por los rizobios puedan estar jugando un papel importante en las diferentes fases del proceso simbiótico.

El tercer capítulo de esta Tesis Doctoral versa sobre el aislamiento y análisis de las MVs liberadas por *R. tropici* CIAT 899 durante el reconocimiento planta-microorganismo que se establece en la rizosfera. En este capítulo se describe de forma detallada un protocolo que ha permitido aislar de forma eficiente las vesículas contenidas en los cultivos de *R. tropici* CIAT 899 en presencia y ausencia del flavonoide apigenina. Esto ha permitido el análisis de las MVs liberadas en dichas condiciones con el fin de averiguar cómo estas partículas podrían afectar en la primera etapa del proceso simbiótico.

El protocolo consiste en una serie de pasos secuenciales de centrifugación, filtración y ultracentrifugación a partir de un cultivo bacteriano, hasta la obtención de un volumen de muestra donde se mantienen concentradas las vesículas procedentes de los cultivos (**Capítulo 3: Figura 1**) Posteriormente, el análisis integrativo de diferentes técnicas de microscopía electrónica, *Nano-sight* y tinción de lípidos van a permitir conocer la

cantidad, integridad y pureza de los aislados vesiculares. Así, la microscopía de transmisión electrónica (TEM) permite visualizar la variabilidad de tamaños y la integridad de las vesículas aisladas. La herramienta *Nano-sight* permite obtener valores cuantitativos de concentración y tamaño de las vesículas presentes en una muestra, y finalmente, el uso de un colorante lipídico (FM4-64) estima la cantidad de MVs basándose en la cantidad de lípidos contenidos en una determinada muestra (**Capítulo 3: Figura 2**).

Tras el aislamiento de las vesículas contenidas en los cultivos de CIAT 899 suplementados con apigenina o sin suplementar, y el análisis exhaustivo de estos aislados mediante TEM, *Nano-sight* y tinción de lípidos, se pudo confirmar no solo el buen funcionamiento del protocolo, sino que la presencia de apigenina en el medio potencia la secreción de MVs en CIAT 899 (**Figura 14**). De hecho, trabajos recientes han confirmado la presencia de NFs en MVs aisladas de cultivos de *R. etli* CE3 en presencia del flavonoide activador naringenina (Taboada *et al.*, 2019). De manera similar, en el caso de la estirpe rizobiana *S. fredii* HH103, se ha confirmado que la presencia del flavonoide genisteína, inductor de la síntesis de NFs, potencia la formación de vesículas extracelulares en esta estirpe, sino que estas MVs liberadas induce la curvatura de los pelos radicales en su planta hospedadora *G. max* (Li *et al.*, 2022). En consonancia con los resultados obtenidos en CIAT 899, estos trabajos sugieren que las MVs liberadas por los rizobios podrían ser importantes durante las primeras etapas del proceso simbiótico ¿Podrían tratarse de la vía o una de las vías de secreción empleada por los rizobios para la liberación de NFs a la rizosfera?

Las vesículas de membrana son un vehículo utilizado por muchos organismos para la liberación de moléculas señales al medio extracelular, ya que asumen un papel importante en la liberación de sustancias hidrofóbicas al medio extracelular, con el fin de favorecer la solubilidad de estas moléculas. Además, sirven como herramienta de protección frente a diversos agentes externos, y no solo eso, sino que su capacidad para mantener concentradas ciertas partículas en su interior garantiza la actividad biológica de estas moléculas y favorece que puedan alcanzar a células dianas a mayores distancias, lo que se conoce como *quantal secretion* (Toyofuku *et al.*, 2023).

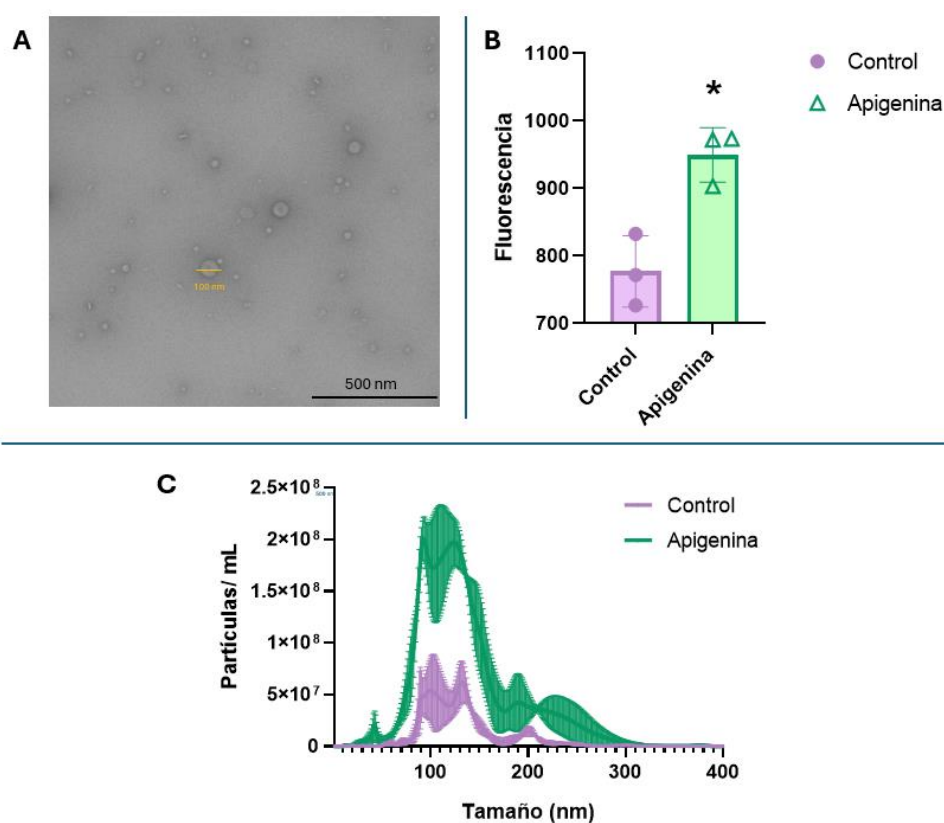


Figura 14. Análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras de MVs aisladas a partir de cultivos de CIAT 899 suplementados con el flavonoide apigenina y sin suplementar (condición control). (A) Imagen tomada a microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las MVs aisladas a partir de un cultivo suplementado con apigenina. (B) Valores de fluorescencia detectados en las muestras de MVs tras la aplicación de un colorante lipídico. (C) Valores de concentración y tamaño de las partículas presentes en las muestras de MVs aisladas con y sin el flavonoide apigenina registrados por *Nano-sight*.

Por otro lado, el esqueleto de los NFs está constituido por subunidades de *N*-acetilglucosamina que portan un ácido graso en su extremo no reductor. Este grupo acilo atribuye cierto carácter hidrofóbico a los NFs y permite a estas moléculas insertarse en las membranas lipídicas (Khokhani *et al.*, 2021; Goedhart *et al.*, 1999). Así, es posible que el encapsulamiento de los NFs en vesículas actúe como un mecanismo adaptativo de los rizobios con el fin de favorecer la solubilidad de estas moléculas en el medio, así como una estrategia para aumentar su vida media y garantizar su actividad biológica en la rizosfera. De hecho, se ha demostrado que otras moléculas anfipáticas liberadas por ciertas bacterias, como las *N*-acil-homoserina lactonas de cadena larga, que también portan un ácido graso de longitud y naturaleza variable, utilizan las MVs como vía

principal para su transporte en los fenómenos de comunicación celular de tipo *Quorum sensing* (Toyofuku *et al.*, 2017).

En la actualidad no se conoce con total certeza la función concreta del ácido graso de los NFs, aunque si se sabe que es esencial para mantener su actividad biológica. Así, se ha demostrado que la aplicación exógena de NFs que no portan el grupo acilo, procedentes de *S. meliloti*, son incapaces de inducir la formación de primordios y de provocar la curvatura de pelos radicales en soja (Staehelin *et al.*, 1994). Algunos autores han sugerido que esta cadena de ácido graso podría intercalarse en la membrana de la célula vegetal con el fin de estabilizarse y favorecer su reconocimiento por parte de los receptores de la planta, mientras que otros trabajos defienden que los NFs se intercalan en la membrana de las bacterias por acción de este ácido graso previamente a ser liberados y reconocidos por las plantas (Staehelin *et al.*, 1994; Orgambide *et al.*, 1995).

Basándonos en todos estos antecedentes y en los resultados obtenidos a partir de la purificación de MVs de CIAT 899, una de las hipótesis que se plantean es la siguiente: la presencia de apigenina activa la síntesis de NFs, que se anclarían a la membrana de la bacteria por acción del ácido graso que los conforman, provocando así, la desestabilización de la membrana y como consecuencia la formación de vesículas cargadas de NFs (**Figura 15A**). Se ha descrito que la inserción de moléculas de carácter hidrófóbico a la membrana de las células provoca su desestabilización y como consecuencia la formación de vesículas extracelulares (Toyofuku *et al.*, 2023). Otra de las posibilidades sería que los NFs quedasen anclados en la superficie exterior de las vesículas tras el fenómeno de conversión de estas moléculas hidrofóbicas hacia la cara externa de la bicapa lipídica de la membrana externa (**Figura 15C**), o bien quedar en la superficie de estos vehículos lipídicos tras ser liberadas al espacio extracelular a través de transportadores de membrana (**Figura 15B**). En este sentido, las proteínas que comúnmente se han relacionado con el transporte de los NFs corresponden a los productos de los genes *nodI* y *nodJ*, que codifican para un transportador de tipo ABC y que junto a *nodT* permite el transporte activo de las moléculas de NFs desde el citoplasma al medio extracelular (López-Lara *et al.*, 1996; Aoki *et al.*, 2013). Curiosamente, mutaciones en los genes *nodI* y *nodJ* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* mantiene la capacidad de secreción de los NFs al mismo nivel que la estirpe parental, sugiriendo la existencia de otros elementos que participen en su secreción. Como respuesta a este hecho, se ha especulado sobre la posible implicación de otros genes que codifican para proteínas transportadoras

similares, como los genes que conforman el operón *nolFGHI* o los genes *nolT*, *nolW* y *nolE*, aunque la funcionalidad de estos transportadores sigue siendo cuestionable por falta de evidencias experimentales (Ghantasala & Roy Choudhury, 2022). Así, estos datos apoyarían la hipótesis de que las vesículas de membrana puedan tratarse de una vía alternativa a la liberación de NFs en la rizosfera.

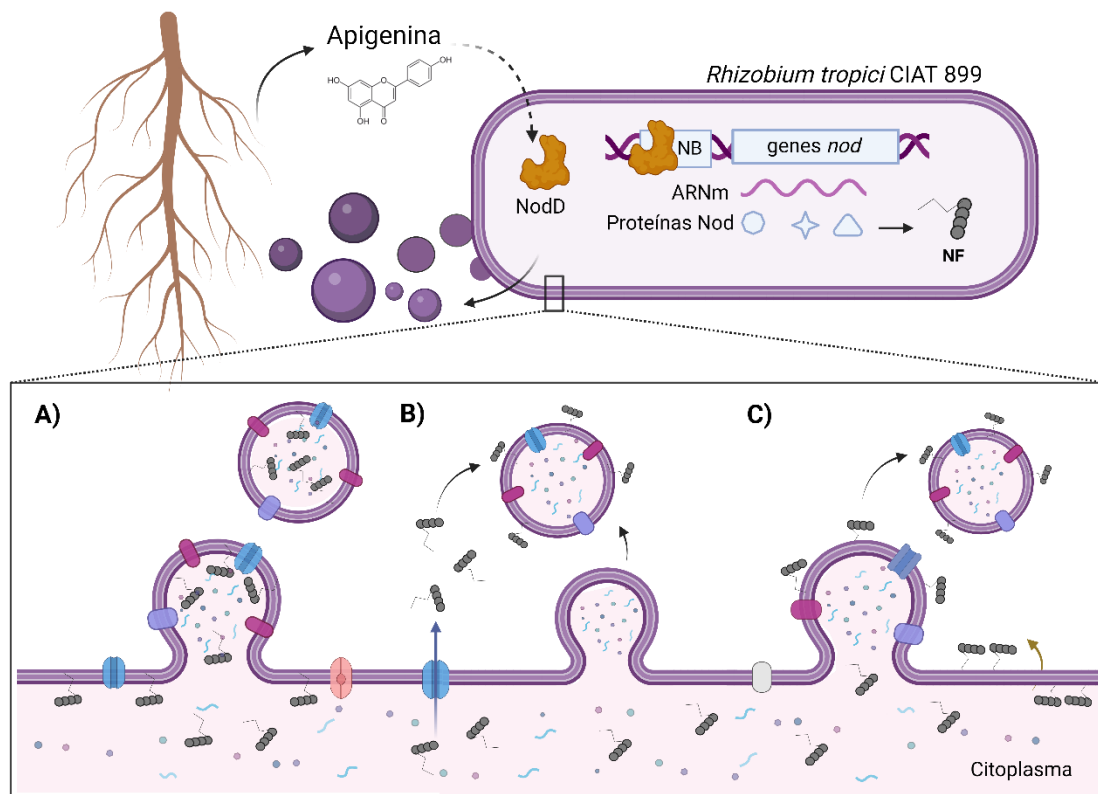


Figura 15. Modelo de secreción de NFs en *R. tropici* CIAT 899 ante la presencia del flavonoide apigenina. (A) Los NFs se anclarían a la membrana celular, lo que favorecería la formación de MVs en las que serían transportados al medio extracelular. (B) Los NFs se liberarían al medio a través de transportadores de membrana y posteriormente se anclarían a la superficie de las MVs. (C) Tras la conversión de los NFs hacia la cara externa de la superficie celular se liberarían en vesículas.

Así mismo, los flavonoides son compuestos de naturaleza fenólica exudados por las raíces de las plantas, que actúan como agentes antimicrobianos de multitud de microorganismos (Huang *et al.*, 2022). Por tanto, otra de las hipótesis que se plantean es que el aumento en la producción de vesículas en CIAT 899 sea efecto directo como respuesta al estrés que

supone la presencia del flavonoide apigenina en el medio, ya que de forma general la presencia de un estrés físico o químico en el medio supone el incremento de la formación de vesículas de membrana en las bacterias (Sartorio *et al.*, 2021).

De cualquier modo, el potenciamiento de la formación de vesículas de forma simultánea a la activación de la síntesis de NFs supondría una gran ventaja en términos de aplicabilidad. Por ejemplo, existen empresas, como Calister o Novozymes, que se dedican a la purificación de NFs y a su comercialización como inoculantes moleculares, para mejorar el rendimiento de los cultivos de plantas leguminosas y no leguminosas. La utilización de vesículas cargadas de NFs podría suponer no solo un probable ahorro económico al tratarse de un proceso natural de secreción, sino un aumento de la vida media de estas moléculas en la rizosfera al estar encapsuladas y protegidas por una membrana lipídica. De hecho, las MVs podrían ser una solución a la problemática europea frente al uso de organismos modificados genéticamente. Por ejemplo, en esta Tesis Doctoral se ha demostrado que la sobreexpresión del regulador NodD2 de CIAT 899 deriva en la síntesis constitutiva de NFs independientemente de la presencia de una molécula inductora en el medio. Este organismo modificado genéticamente no se podría aplicar directamente sobre los cultivos, pero sí sus vesículas aisladas y cargadas de NFs.

En definitiva, el establecimiento de un protocolo que garantice el aislamiento de vesículas rizobianas en condiciones de vida libre, proporciona el estudio de estas nanoesferas a diferentes niveles -ómicos, abriendo puertas a la identificación de nuevos determinantes simbióticos. Además, el escalado en la producción de estos vehículos moleculares podría hacer surgir una potente herramienta para la aplicación y mejora del rendimiento de los cultivos.

Durante los últimos 20 años se han logrado grandes avances en el estudio de la simbiosis rizobio-leguminosa, concretamente en lo relativo a la señalización que se establece entre la planta y el microorganismo en la rizosfera. Sin embargo, el éxito de la simbiosis reside en su mayor parte en los nódulos, donde las células simbióticas albergan a los bacteroides y tiene lugar la fijación biológica de nitrógeno, y para lo que se requiere del funcionamiento de numerosos procesos de transporte de membranas, interacciones proteicas y regulación de procesos osmóticos (Fedorova, 2013). En los nódulos, los bacteroides quedan rodeados por la membrana de la célula vegetal (célula simbiótica), que recibe el nombre de membrana peribacteroidea (o membrana simbiosimal),

denominándose al conjunto de bacteroides y a la membrana peribacteroidea que los engloba, simbiosoma (Mergaert *et al.*, 2006; Oldroyd, 2013). El espacio existente entre la membrana peribacteroidea y la membrana del bacteroide se le conoce como espacio peribacteroideo (o espacio simbiosomal), y va a desempeñar un papel fundamental en la comunicación entre ambas células, ya que va a actuar como interfaz en el intercambio de señales entre la célula simbiótica y el bacteroide (Poole & Ledermann, 2022). Este intercambio de señales implica el transporte bidireccional de sustancias entre la célula simbiótica y los bacteroides, de modo que los elementos tienen que traspasar ambas barreras, la peribacteroidea y la del bacteroide, para alcanzar el citoplasma de destino. (Poole & Ledermann, 2022; Ledermann *et al.*, 2021). Además, como se ha mencionado con anterioridad, el mantenimiento de unas condiciones osmóticas óptimas en el espacio peribacteroideo resulta clave para el correcto funcionamiento y desarrollo de los nódulos (Tian *et al.*, 2022).

Basándonos en estos antecedentes surge la idea de que las MVs, que actúan como portadores extracelulares de metabolitos y diferentes moléculas señales, puedan participar activamente en el intercambio de información entre ambos organismos en el nódulo. Así, el último capítulo de esta Tesis Doctoral se centra en la descripción detallada de un protocolo que permite aislar vesículas extracelulares de membrana de los bacteroides presentes en los nódulos desarrollados en la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. tropici* CIAT 899. Este protocolo ha permitido, en primer lugar, demostrar por primera vez la presencia de vesículas en el espacio peribacteroideo de los nódulos de judía infectados por CIAT 899 Y, asimismo, ha permitido realizar un análisis preliminar del contenido proteómico de estas vesículas, con el objetivo de ampliar el conocimiento de los mecanismos moleculares que tienen lugar en el interior de los nódulos.

Tras aplicar este protocolo, se pudo observar mediante TEM la presencia de vesículas en las muestras (**Figura 16**). Pero ¿pertencen las partículas esféricas que se observan a MVs liberadas por los bacteroides? Podría ser así o podrían corresponder a vesículas liberadas por la célula vegetal o, lo más probable, a una mezcla de ambas. De hecho, en las imágenes obtenidas a partir de las muestras de MVs, se puede observar una gran variabilidad de tamaño de partículas, encontrando algunas esferas que alcanzan los 400 nm de diámetro (**Figura 16**). Este tamaño de vesículas es significativamente superior a los registrados por *Nano-sight* y TEM de las MVs de CIAT 899 liberadas en vida libre, que oscilan entre los 50-250 nm (**Figura 14 A y C**). Por lo tanto, es muy probable que las

MVs presentes en las muestras correspondan a una mezcla de vesículas procedentes de ambos organismos, lo que cabría esperar al establecerse una comunicación bidireccional entre la célula simbiótica y los bacteroides.

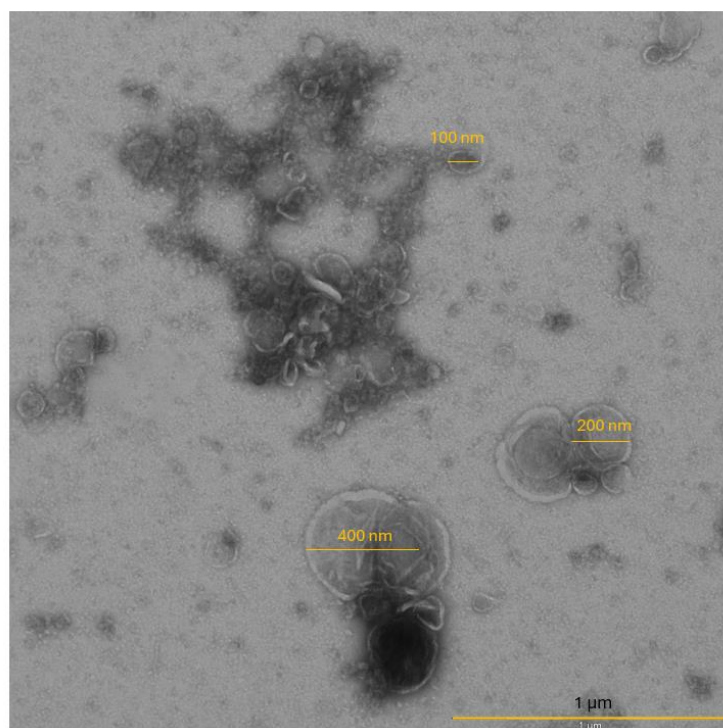


Figura 16. Análisis mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM) de las muestras de MVs aisladas del espacio peribacteroideo de los nódulos desarrollados en la simbiosis entre *P. vulgaris* y *R. tropici* CIAT 899.

Por otro lado, se han realizado análisis proteómicos que han permitido confirmar la presencia de proteínas bacterianas en las MVs procedentes del espacio peribacteroideo de los nódulos de judía. Cabe mencionar que la escasez de proteínas identificadas en estos aislados vesiculares (de tan solo 74 proteínas diferentes), y sobre todo, la ausencia de proteínas ribosomales y de otras proteínas que son muy abundantes en el citoplasma han permitido confirmar la ausencia de contaminantes por bacteroides en las muestras. Otro dato que destacar es que aproximadamente el 40% de las proteínas identificadas corresponden a proteínas de membrana de la bacteria, principalmente destinadas al transporte, lo que corrobora que al menos, parte de las vesículas aisladas proceden de la membrana de los bacteroides de CIAT 899. Sin embargo, estos resultados proteómicos se han obtenido después de la publicación del protocolo de aislamiento de MVs a partir

de bacteroides al que corresponde el último capítulo de esta Tesis Doctoral. Por este motivo, y con vistas a poder ser publicados próximamente, no se muestra el listado detallado de todas las proteínas identificadas en las muestras, sino algunos ejemplos de aquellas proteínas rizobianas cuyo papel podría estar relacionado con el éxito simbiótico y la interacción directa con la célula eucariota hospedadora (**Tabla 5**).

Tabla 5. Algunas de las proteínas identificadas en las MVs liberadas por los bacteroides de *R. tropici* CIAT 899 de los nódulos desarrollados en *P. vulgaris*. Se indica el número de identificación de la base de datos GEO (del inglés, *Gene Expression Omnibus*) de cada una de estas proteínas.

LOCUS_TAG	Gen	Proteína	Función	GEO
<i>rtciat899_pb02695</i>	<i>nolG</i>	AGB73763.1	Familia de transportadores de tipo RND	C:GO:0016020; F:GO:0022857; P:GO:0055085
<i>rtciat899_pb00915</i>	<i>hypF</i>	AGB73463.1	Carbamoiltransferasa	F:GO:0003725; F:GO:0003998; F:GO:0008270; F:GO:0016743; F:GO:0016874
<i>rtciat899_ch13315</i>		AGB72042.1	Helicasa de ARN de la familia DEAD/DEAH-box	F:GO:0003676; F:GO:0003724; F:GO:0005524; F:GO:0016787

Entre las proteínas identificadas, predominan las proteínas de la bomba de eflujo de tipo RND (del inglés, *Resistance Nodulation and cell Division*). Esta familia de transportadores de membrana está implicada en la resistencia a metales pesados ®, en nodulación (N) o en la división celular (D), de ahí su siglas RND (Saier *et al.*, 1994; Tseng *et al.*, 1999). Una de las proteínas detectadas en las muestras de MVs aisladas de los nódulos corresponde a la proteína codificada por gen *nolG* de CIAT 899 (con acceso AGB73763.1). Curiosamente, el gen *nolG* de *S. meliloti* se activa en respuesta al flavonoide inductor luteolina y se requiere para nodular de forma óptima en la alfalfa (Baev *et al.*, 1991). Sin embargo, a pesar de numerosos y profundos estudios sobre el funcionamiento de *NolG* y el sistema de transporte al que pertenece, como realizó Alías-Villegas en su Tesis Doctoral (2016), la función concreta de esta proteína sigue sin ser clara.

Otra de las proteínas identificadas es el factor de maduración de la hidrogenasa HypF de CIAT 899 (AGB73463.1). Un estudio reciente ha revelado que la proteína de maduración de hidrogenasa HypE de *Mesorhizobium huakuii* es esencial en el proceso de fijación de nitrógeno, además de desempeñar otros papeles importantes en bacterias, como el aporte de energía, la detoxificación, o la diferenciación a bacteroides y senescencia del nódulo (Long *et al.*, 2023).

Además de diversas proteínas implicadas en defensa y en la respuesta a estrés, resulta llamativo que un 10% de las proteínas identificadas estén relacionadas con el metabolismo del ARN. Un ejemplo es la proteína AGB72042.1, que corresponde a una helicasa de ARN de la familia de helicasas DEAD/DEAH-box. Esta familia de helicasas está implicada en todas las facetas del metabolismo de ARN, incluyendo la maduración del ARN mensajero (ARNm), el procesamiento de ARN pequeños (ARNs) o la transcripción y traslocación del ARN (Linder & Jankowsky, 2011; Perčulija & Ouyang, 2019). Con relación a los ARNs, se ha demostrado que estas moléculas pueden viajar de un organismo a otro con el fin de inducir el silenciamiento de genes en otras células, lo que se conoce como comunicación entre reinos mediante ARN interferente (Cheng *et al.*, 2023). Concretamente, estos ARN pequeños juegan un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune y en los procesos de virulencia de las plantas. Por ejemplo, en la interacción planta-hongo, los ARNs procedentes de hongos patógenos viajan hacia las células de su planta hospedadora para silenciar la respuesta inmunológica de la planta, y del mismo modo, los ARNs de la planta son conducidos hacia el hongo para suprimir el sistema de virulencia del patógeno (Cai *et al.*, 2018; Weiberg *et al.*, 2013). Posteriormente, se ha descubierto que la planta libera estos ARNs a través de vesículas y que son las proteínas de unión a ARN las encargadas de cargar estos ARNs específicos en las vesículas de la planta (Cai *et al.*, 2019; He *et al.*, 2021).

Respecto al papel de los ARNs en la simbiosis rizobio-leguminosa, en la literatura reciente se encuentran algunos estudios en los que se demuestra la importancia y el papel regulador de los ARNs sintetizados por las plantas durante el establecimiento de la simbiosis (Nhung *et al.*, 2019; Chand *et al.*, 2021; Castaingts *et al.*, 2022; Jing *et al.*, 2022). Sin embargo, la investigación acerca de la regulación de los ARNs en rizobios es muy limitada, y hasta el momento estos estudios se han centrado casi exclusivamente en la especie *S. meliloti*, donde se ha hipotetizado que un gran número de ARNs podrían afectar al proceso de nodulación, aunque aún se conocen muy pocos aspectos sobre el

mecanismo de biosíntesis y la función de estos ARNs (Jiménez-Zurdo *et al.*, 2013; Jiménez-Zurdo & Robledo, 2015; del Val *et al.*, 2012; Robledo *et al.*, 2020). Un ejemplo es el ARNs NfeR1 de *S. meliloti*, cuyos niveles de expresión son máximos en condiciones de estrés por hambre de nitrógeno y en los bacteroides (García-Tomsig *et al.*, 2023). También se ha descrito que ARNs que derivan de los ARN transferentes (ARNt) de *B. japonicum* se inducen durante el proceso de infección en los bacteroides de los nódulos de soja. Es más, se ha especulado que estos ARNs podrían tener como diana diferentes genes del genoma de la planta (Ren *et al.*, 2019). Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, una hipótesis plausible sería que las helicasas de ARN identificadas en las MVs aisladas de los bacteroides ayudasen a cargar ciertos ARNs con el fin último de actuar como vía para el transporte de ARNs desde el bacteroide hacia el genoma de la célula simbiótica. Para comprobar esta hipótesis, sería realmente interesante llevar a cabo estudios transcriptómicos comparativos de la MVs aisladas del espacio peribacteroideo de los nódulos de *P. vulgaris* colonizados por una estirpe mutante en el gen que codifica para la helicasa HypF de CIAT 899 y la estirpe silvestre, con el fin de identificar aquellos ácidos ribonucleicos cargados específicamente en las MVs por acción de esta helicasa.

En resumen, estos ejemplos demuestran que el establecimiento de un protocolo que permite purificar de forma fácil y satisfactoria las vesículas de membrana del espacio peribacteroideo es una potente y novedosa herramienta para seguir avanzando en el estudio de los mecanismos que gobiernan el funcionamiento de los nódulos y, sobre todo, permitir identificar nuevos actores implicados en el proceso simbiótico.

CONCLUSIONES

1. El gen *onfD* de *R. tropici* CIAT 899 codifica para un regulador transcripcional de la familia AraC que resulta esencial en la síntesis y liberación de factores de nodulación en esta bacteria bajo condiciones de estrés osmótico.
2. Los reguladores NodD2 y OnfD de *R. tropici* CIAT 899 interactúan entre sí y actúan conjuntamente en la activación de los genes simbióticos y la síntesis de factores Nod en condiciones de estrés osmótico.
3. La activación transcripcional de los genes simbióticos de *R. tropici* CIAT 899 por acción del regulador NodD2 bajo una condición de estrés osmótico en el medio es consecuencia de un aumento de expresión del gen *nodD2* y no por la presencia de una molécula inductora en el medio.
4. La sobreexpresión heteróloga del gen *nodD2* de *R. tropici* CIAT 899 en otros rizobios puede expandir su rango de hospedador.
5. El regulador NodD4 de *R. tropici* CIAT 899 induce levemente la expresión del gen *nodA* en presencia de apigenina, lo que resulta la formación de un bajo número de nódulos en *L. burttii*.
6. Se confirma con éxito el aislamiento y análisis de las vesículas de membrana liberadas por la estirpe CIAT 899 en presencia y ausencia del flavonoide apigenina, permitiendo el estudio de estas partículas en la primera etapa del proceso simbiótico.
7. Se confirma la presencia de vesículas de membrana en el espacio peribacteroideo de los nódulos desarrollados en la simbiosis de *R. tropici* CIAT 899 y *P. vulgaris*.

1. The *onfD* gene of *R. tropici* CIAT 899 encodes for a AraC family transcriptional regulator that is essential in the synthesis and secretion of NFs under osmotic stress conditions.
2. The *R. tropici* CIAT 899 NodD2 and OnfD regulators could interact and carry out together the symbiotic gene activation and Nod factors synthesis under osmotic stress conditions.
3. The transcriptional induction of the symbiotic genes by NodD2 in *R. tropici* CIAT 899 under an osmotic stress is consequence of an increase in the *nodD2* expression and not by the presence of a signal molecule.
4. The heterologous overexpression of the *R. tropici* CIAT 899 *nodD2* gene in other rhizobia may expand their host range.
5. The NodD4 protein of CIAT 899 slightly induces the expression of *nodA* genes in the presence of apigenin and a low number of nodules in *L. burtii* plants.
6. The successful isolation and analysis of membrane vesicles released by *R. tropici* CIAT 899 in the presence and absence of the flavonoid apigenin is confirmed. In this way, the roll of these particles in the first stage of the symbiotic process can be studied.
7. The presence of membrane vesicles in the peribacteroid space of the nodules developed in the symbiosis of *R. tropici* CIAT 899 and *P. vulgaris* is confirmed.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Jurado, S., Rodríguez-Navarro, D. N., Kawaharada, Y., Perea, J. F., Gil-Serrano, A., Jin, H., *et al.* (2016a). *Sinorhizobium fredii* HH103 invades *Lotus burtii* by crack entry in a Nod Factor and surface polysaccharide dependent manner. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *29*, 925-937.
- Acosta-Jurado, S., Navarro-Gómez, P., Murdoch, P. D. S., Crespo-Rivas, J. C., Jie, S., Cuesta-Berrio, L., *et al.* (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., Rodríguez-Carvajal, M. A., Gil-Serrano, A., Soria-Díaz, M. E., *et al.* (2019). *Sinorhizobium fredii* HH103 *nolR* and *nodD2* mutants gain capacity for infection thread invasion of *Lotus japonicus* Gifu and *Lotus burtii*. *Environmental Microbiology*, *21*, 1718-1739.
- Acosta-Jurado, S., Alías-Villegas, C., Almozara, A., Espuny, M. R., Vinardell, J. M., & Pérez-Montaño, F. (2020). Deciphering the symbiotic significance of quorum sensing systems of *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microorganisms*, *8*, 68.
- Acosta-Jurado, S., Fuentes-Romero, F., Ruiz-Sainz, J. E., Janczarek, M., & Vinardell, J. M. (2021). Rhizobial exopolysaccharides: Genetic regulation of their synthesis and relevance in symbiosis with legumes. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*, 6233.
- Alías-Villegas, C., Fuentes-Romero, F., Cuéllar, V., Navarro-Gómez, P., Soto, M. J., Vinardell, J. M., & Acosta-Jurado, S. (2022). Surface motility regulation of *Sinorhizobium fredii* HH103 by plant flavonoids and the NodD1, TtsI, NolR, and MucR1 symbiotic bacterial regulators. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*, 7698.
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, *181*, 4725-4733.
- Bonnington, K. E., & Kuehn, M. J. (2014). Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1843*, 1612-1619.

- Bringhurst, R. M., & Gage, D. J. (2000). An AraC-like transcriptional activator is required for induction of genes needed for α -galactoside utilization in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiology Letters*, *188*, 23-27.
- Brito-Santana, P., Duque-Pedraza, J. J., Bernabéu-Roda, L. M., Carvia-Hermoso, C., Cuéllar, V., Fuentes-Romero, F., *et al.* (2023). *Sinorhizobium meliloti* DnaJ is required for surface motility, stress tolerance, and for efficient nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*, 5848.
- Cangioli, L., Vaccaro, F., Fini, M., Mengoni, A., & Fagorzi, C. (2022). Scent of a symbiont: the personalized genetic relationships of *Rhizobium*-plant interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*, 3358.
- Carvalho, F. P. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science & Policy*, *9*, 685-692.
- Cesco, S., Neumann, G., Tomasi, N., Pinton, R., & Weiskopf, L. (2010). Release of plant-borne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition. *Plant and Soil*, *329*, 1-25.
- Chowdhury, C., & Jagannadham, M. V. (2013). Virulence factors are released in association with outer membrane vesicles of *Pseudomonas syringae* pv. tomato T1 during normal growth. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1834*, 231-239.
- Colebatch, G., Desbrosses, G., Ott, T., Krusell, L., Montanari, O., Kloska, S., *et al.* (2004). Global changes in transcription orchestrate metabolic differentiation during symbiotic nitrogen fixation in *Lotus japonicus*. *The Plant Journal*, *39*, 487-512.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R., & Bono, J. J. (2001). Perception of lipochitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in Plant Science*, *6*, 24-30.
- Deakin, W. J., & Broughton, W. J. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, *7*, 312-320.
- del Cerro, P., Rolla-Santos, A. A. P., Gomes, D. F., Marks, B. B., Pérez-Montaño, F., Rodríguez-Carvajal, M. A., *et al.* (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, 1-13.

del Cerro, P., Rolla-Santos, A. A. P., Gomes, D. F., Marks, B. B., Espuny, M. R., Rodríguez-Carvajal, M. A., et al. (2015b). Opening the “black box” of nodD3, nodD4 and nodD5 genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899. *BMC Genomics*, 16, 1-10.

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. *Scientific Reports*, 7, 46712.

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.

De Ron, A. M., Papa, R., Bitocchi, E., González, A. M., Debouck, D. G., Brick, M. A., et al. (2015). Common bean. En: Grain Legumes. Handbook of Plant Breeding. De Ron, A. M. (ed.). Springer, New York. pp. 1-36. ISBN: 978-1-4939-2797-5.

Desbrosses, G. G., Kopka, J., & Udvardi, M. K. (2005). *Lotus japonicus* metabolic profiling. Development of gas chromatography-mass spectrometry resources for the study of plant-microbe interactions. *Plant Physiology* 137, 1302-1318.

D’Haeze, W., & Holsters, M. (2002). Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology*, 12, 79R-105R.

Downie, J. A. (1998). Functions of rhizobial nodulation genes. En: The *Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria*. Spaink, H. P., Kondorosi, A., & Hooykaas, P. J. J. (eds.). Springer, Dordrecht. pp. 387-402. ISBN: 978-94-011-5060-6.

Downie, J. A. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 150-170.

- Dreyfus, B., Garcia, J. L., & Gillis, M. (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 38, 89-98.
- Esseling, J. J., Lhuissier, F. G., & Emons, A. M. C. (2003). Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiology*, 132, 1982-1988.
- Estévez, J., Soria-Díaz, M. E., De Córdoba, F. F., Morón, B., Manyani, H., Gil, A., *et al.* (2009). Different and new Nod factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899 following Na⁺ stress. *FEMS Microbiology Letters*, 293, 220-231.
- Fauvart, M., & Michiels, J. (2008). Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS Microbiology Letters*, 285, 1-9.
- Fagotti, D. S. L., Abrantes, J. L. F., Cerezini, P., Fukami, J., Nogueira, M. A., del Cerro, P., *et al.* (2019). Quorum sensing communication: *Bradyrhizobium-Azospirillum* interaction via N-acyl-homoserine lactones in the promotion of soybean symbiosis. *Journal of Basic Microbiology*, 59, 38-53.
- Fellay, R., Hanin, M., Montorzi, G., Frey, J., Freiberg, C., Golinowski, W., *et al.* (1998). *nodD2* of *Rhizobium* sp. NGR234 is involved in the repression of the *nodABC* operon. *Molecular Microbiology*, 27, 1039-1050.
- Feitosa-Junior, O. R., Stefanello, E., Zaini, P. A., Nascimento, R., Pierry, P. M., Dandekar, A. M., *et al.* (2019). Proteomic and metabolomic analyses of *Xylella fastidiosa* OMV-enriched fractions reveal association with virulence factors and signaling molecules of the DSF family. *Phytopathology*, 109, 1344-1353.
- 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. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52, 61-76.
- Ferguson, S., Major, A. S., Sullivan, J. T., Bourke, S. D., Kelly, S. J., Perry, B. J., & Ronson, C. W. (2020). *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* NodD2 enhances

competitive nodule colonization in the clover-rhizobium symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 86, e01268-20.

Fernández-Aunión, C., Hamouda, T. B., Iglesias-Guerra, F., Argandona, M., Reina-Bueno, M., Nieto, J. J., *et al.* (2010). Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC Microbiol*, 10, 192.

Ferraz Helene, L. C., Klepa, M. S., & Hungria, M. (2022). New insights into the taxonomy of bacteria in the genomic era and a case study with rhizobia. *International Journal of Microbiology*, 2022.

Folch-Mallol, J. L., Marroqui, S., Sousa, C., Manyani, H., López-Lara, I. M., van der Drift, K. M., *et al.* (1996). Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 nodulation factors: the role of *nodH* and *nodPQ* genes in their sulfation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9, 151-163.

Folch-Mallol, J. L., Manyani, H., Marroquí, S., Sousa, C., Vargas, C., Nava, N., *et al.* (1998). Sulfation of Nod factors via *nodHPQ* is *nodD* independent in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11, 979-987.

Fournier, J., Timmers, A. C., Sieberer, B. J., Jauneau, A., Chabaud, M., & Barker, D. G. (2008). Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization. *Plant Physiology*, 148, 1985-1995.

Fuqua, W. C., Winans, S. C., & Greenberg, E. P. (1994). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology*, 176, 269-275.

Fujishige, N. A., Lum, M. R., De Hoff, P. L., Whitelegge, J. P., Faull, K. F., & Hirsch A. M. (2006). *Rhizobium* common *nod* genes are required for biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 67, 504-515.

Fuentes-Romero, F., Moyano-Bravo, I., Ayala-García, P., Rodríguez-Carvajal, M. Á., Pérez-Montaño, F., Acosta-Jurado, S., *et al.* (2023). Non-ionic osmotic stress induces the

biosynthesis of nodulation factors and affects other symbiotic traits in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Biology*, *12*, 148.

Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *68*, 280-300.

Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., & Ramos, J. L. (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *61*, 393-410.

Galloway, J.N., Townsend, A.R., Erismann, J.W., Bekunda, M., Cai, Z., Freney, J.R., *et al.* (2008). Transformation of the nitrogen cycle: recent trends, questions, and potential solutions. *Science*, *320*, 889-892.

Ghantasala, S., & Roy Choudhury, S. (2022). Nod factor perception: An integrative view of molecular communication during legume symbiosis. *Plant Molecular Biology*, *110*, 485-509.

Gilbert, P., Das, J., & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances in Dental Research*, *11*, 160-167.

Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., *et al.* (2007). Legumes symbioses: absence of *nod* genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science*, *316*, 1307-1312.

Gomes, D. F., Ormeño-Orrillo, E., & Hungria, M. (2015). Biodiversity, symbiotic efficiency, and genomics of *Rhizobium tropici* and related species. En: *Biological Nitrogen Fixation*. De Bruijn, F. J. (ed.). John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. pp. 747-756. ISBN: 9781118637043.

González-Sama, A., Lucas, M. M., De Felipe, M. R., & Pueyo, J. J. (2004). An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*). *New Phytologist*, 371-380.

- Goormachtig, S., Capoen, W., James, E. K., & Holsters, M. (2004). Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*, 6303-6308.
- Graham, P. H., Draeger, K. J., Ferrey, M. L., Conroy, M. J., Hammer, B. E., Martínez, E., *et al.* (1994). Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*, *40*, 198-207.
- Graham, P. H., & Vance, C. P. (2000). Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, *65*, 93-106.
- Guasch-Vidal, B., Estévez, J., Dardanelli, M. S., Soria-Díaz, M. E., de Córdoba, F. F., Balog, C. I. A., *et al.* (2013). High NaCl concentrations induce the *nod* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899 in the absence of flavonoid inducers. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *26*, 451-460.
- Guerrero-Mandujano, A., Hernández-Cortez, C., Ibarra, J. A., & Castro-Escarpulli, G. (2017). The outer membrane vesicles: secretion system type zero. *Traffic*, *18*, 425-432.
- Hassan, S., & Mathesius, U. (2012). The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *Journal of Experimental Botany*, *63*, 3429-3444.
- Haurat, M. F., Elhenawy, W., & Feldman, M. F. (2015). Prokaryotic membrane vesicles: new insights on biogenesis and biological roles. *Biological Chemistry*, *396*, 95-109.
- Hoffman, B. M., Lukoyanov, D., Yang, Z. Y., Dean, D. R., & Seefeldt, L. C. (2014). Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chemical Reviews*, *114*, 4041-4062.
- Hou, B., Li, F., Yang, X. E., & Hong, G. (2009). A small functional intramolecular region of NodD was identified by mutation. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)*, *4*, 822-830.

- Hungria, M., Joseph, C. M., & Phillips, D. A. (1991). *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology*, 97, 759-764.
- Hungría, M., de S Andrade, D., de O Chueire, L. M., Probanza, A., Gutiérrez-Mañero, F.J., & Megías, M. (2000). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 1515-1528.
- Hungria, M., Campo, R. J. & Mendes, I. C. (2003). Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biology and Fertility of Soils*, 39, 88-93.
- Hunter, M. C., Smith, R. G., Schipanski, M. E., Atwood, L. W., & Mortensen, D. A. (2017). Agriculture in 2050: recalibrating targets for sustainable intensification. *Bioscience*, 67, 386-391.
- Jameson, P. E. (2000). Cytokinins and auxins in plant-pathogen interactions: an overview. *Plant Growth Regulation*, 32, 369-380.
- Jan, A. T. (2017). Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1053.
- Janczarek, M. (2011). Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 7898-7933.
- Jiménez-Guerrero, I., Pérez-Montaña, F., Monreal, J. A., Preston, G. M., Fones, H., Vioque, B., *et al.* (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.
- Jiménez-Guerrero, I., Acosta-Jurado, S., Medina, C., Ollero, F. J., Alías-Villegas, C., Vinardell, J. M., *et al.* (2020). The *Sinorhizobium fredii* HH103 type III secretion system effector NopC blocks nodulation with *Lotus japonicus* Gifu. *Journal of Experimental Botany*, 71, 6043-6056.

- Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Borrero-de Acuña, J. M., & Pérez-Montaña, F. (2023). Membrane vesicle engineering with “à la carte” bacterial-immunogenic molecules for organism-free plant vaccination. *Microbial Biotechnology*, *16*, 2223-2235.
- Journet, L., & Cascales, E. (2016). The type VI secretion system in *Escherichia coli* and related species. *EcoSal Plus*, *7*, 10-1128.
- Karavidas, I., Ntatsi, G., Vougeleka, V., Karkanis, A., Ntanasi, T., Saitanis, C., *et al.* (2022). Agronomic practices to increase the yield and quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a systematic review. *Agronomy*, *12*, 27.
- Katsir, L., & Bahar, O. (2017). Bacterial outer membrane vesicles at the plant-pathogen interface. *PLoS Pathogens*, *13*, e1006306.
- Kawaguchi, M., Pedrosa-Harand, A., Yano, K., Hayashi, M., Murooka, Y., Saito, K., *et al.* (2005). *Lotus burtii* takes a position of the third corner in the *Lotus* molecular genetics triangle. *DNA Research*, *12*, 69-77.
- Kawaharada, Y., Nielsen, M. W., Kelly, S., James, E. K., Andersen, K. R., Rasmussen, S. R., *et al.* (2017). Differential regulation of the Epr3 receptor coordinates membrane-restricted rhizobial colonization of root nodule primordia. *Nature Communications*, *8*, 14534.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols*, *10*, 845-858.
- Kelly, S., Mun, T., Stougaard, J., Ben, C., & Andersen, S. U. (2018). Distinct *Lotus japonicus* transcriptomic responses to a spectrum of bacteria ranging from symbiotic to pathogenic. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1218.
- Khokhani, D., Carrera Carriel, C., Vayla, S., Irving, T. B., Stonoha-Arther, *et al.* (2021). Deciphering the chitin code in plant symbiosis, defense, and microbial networks. *Annual Review of Microbiology*, *75*, 583-607.
- Kitagawa, W., Takami, S., Miyauchi, K., Masai, E., Kamagata, Y., Tiedje, J. M., & Fukuda M. (2002). Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from

oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. *Journal of Bacteriology*, 184, 509-518.

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. *Molecular Microbiology*, 51, 335-347.

Koeppen, K., Hampton, T. H., Jarek, M., Scharfe, M., Gerber, S. A., Mielcarz, D. W., *et al.* (2016). A novel mechanism of host-pathogen interaction through sRNA in bacterial outer membrane vesicles. *PLoS Pathogens*, 12, e1005672.

Kotecka, K., Kawalek, A., Kobylecki, K., & Bartosik, A. A. (2021). The AraC-type transcriptional regulator GliR (PA3027) activates genes of glycerolipid metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 5066.

Kostiuk, N. V., Belyakova, M. B., Leshchenko, D. V., Miniaev, M. V., Petrova, M. B., & Kharitonova, E. A. (2013). Structural characterization of the NodD transcription factor. *American Journal of Bioinformatics Research*, 3, 35-41.

Laeremans, T., & Vanderleyden, J. (1998). Infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 787-808.

Lamrabet, Y., Bellogín, R. A., Cubo, T., Espuny, R., Gil, A., Krishnan, H. B., *et al.* (1999). Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12, 207-217.

Li, D., Li, Z., Wu, J., Tang, Z., Xie, F., Chen, D., *et al.* (2022). Analysis of outer membrane vesicles indicates that glycerophospholipid metabolism contributes to early symbiosis between *Sinorhizobium fredii* HH103 and soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 35, 311-322.

Li, Y., Hu, Y., Francis, M.S., & Chen, S. (2015). RcsB positively regulates the *Yersinia* Ysc-Yop type III secretion system by activating expression of the master transcriptional regulator LcrF. *Environmental Microbiology*, 17, 1219-1233.

- Li, J., Azam, F. & Zhang, S. (2016). Outer membrane vesicles containing signalling molecules and active hydrolytic enzymes released by a coral pathogen *Vibrio shilonii* AK1. *Environmental Microbiology*, *18*, 3850-3866.
- Li, C., Zhu, L., Wang, D., Wei, Z., Hao, X., Wang, Z., *et al.* (2022). T6SS secretes an LPS-binding effector to recruit OMVs for exploitative competition and horizontal gene transfer. *The ISME Journal*, *16*, 500-510.
- Lindmark, B., Rompikuntal, P. K., Vaitkevicius, K., Song, T., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E., *et al.* (2009). Outer membrane vesicle-mediated release of cytolethal distending toxin (CDT) from *Campylobacter jejuni*. *BMC Microbiology*, *9*, 1-10.
- Lindström, K., & Mousavi, S. A. (2020). Effectiveness of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbial Biotechnology*, *13*, 1314-1335.
- Liu, Y., Wu, L., Baddeley, J. A., & Watson, C. A. (2011). Models of biological nitrogen fixation of legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, *31*, 155-172.
- Lipscomb, L., & Schell, M. A. (2011). Elucidation of the regulon and *cis*-acting regulatory element of HrpB, the AraC-type regulator of a plant pathogen-like type III secretion system in *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Bacteriology*, *193*, 1991-2001.
- López-Baena, F. J., Vinardell, J. M., Pérez-Montano, F., Crespo-Rivas, J. C., Bellogín, R. A., Espuny, M. R., & Ollero, F. J. (2008). Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology*, *154*, 1825-1836.
- 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. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*, E755.
- Lynch, D., O'Brien, J., Welch, T., Clarke, P., Cuiv, P. O., Crosa, J. H., & O'Connell, M. (2001). Genetic organization of the region encoding regulation, biosynthesis, and transport of rhizobactin 1021, a siderophore produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, *183*, 2576-2585.

- McIver, J., Djordjevic, M. A., Weinman, J. J., Bender, G. L., & Rolfe, B. G. (1989). Extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* caused by point mutations in *nodD* that result in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2, 97-106.
- Maddocks, S. E., & Oyston, P. C. (2008). Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. *Microbiology*, 154, 3609-3623.
- Mattingly, A. E., Weaver, A. A., Dimkovikj, A., & Shrout, J. D. (2018). Assessing travel conditions: environmental and host influences on bacterial surface motility. *Journal of Bacteriology*, 200, e00014-18.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., & Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41, 417-426.
- Martínez-Romero, E. (2003). Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil*, 252, 11-23.
- Martínez-Romero, E. (2009). Coevolution in *Rhizobium*-legume Symbiosis? *DNA and Cell Biology*, 28, 361-370.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola*, 4, 1-20.
- Miller, J. B., Pratap, A., Miyahara, A., Zhou, L., Bornemann, S., Morris, R. J., & Oldroyd, G. E. (2013). Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase is negatively and positively regulated by calcium, providing a mechanism for decoding calcium responses during symbiosis signaling. *The Plant Cell*, 25, 5053-5066.
- Mbengue, M. D., Hervé, C., & Debellé, F. (2020). Nod factor signaling in symbiotic nodulation. En: *Advances in Botanical Research*. Frendo, P., Frugier, F. & Masson-Boivin, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam. pp. 1-39. ISBN: 978-0-08-102798-1.

- Montiel, J., Reid, D., Grønbæk, T. H., Benfeldt, C. M., James, E. K., Ott, T., *et al.* (2021). Distinct signaling routes mediate intercellular and intracellular rhizobial infection in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, *185*, 1131-1147.
- Madsen, L. H., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J. T., Heckmann, A. B., Bek, A. S., *et al.* (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, *1*, 10.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., *et al.* (2006). Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*, 5230-5235.
- Miller, M. B., & Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, *55*, 165-199.
- Minami, E., Kouchi, H., Cohn, J. R., Ogawa, T., & Stacey, G. (1996). Expression of the early nodulin, ENOD40, in soybean roots in response to various lipo-chitin signal molecules. *The Plant Journal*, *10*, 23-32.
- Moreau, D., Bardgett, R. D., Finlay, R. D., Jones, D. L., & Philippot, L. (2019). A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. *Functional Ecology*, *33*, 540-552.
- Morón, B., Soria-Díaz, M. E., Ault, J., Verroios, G., Noreen, S., Rodríguez-Navarro, D. N., *et al.* (2005). Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chemistry & Biology*, *12*, 1029-1040.
- Mulligan, J. T., & Long, S. R. (1985). Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudate requires *nodD*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, *82*, 6609-6613.
- Nelson, M. S., & Sadowsky, M. J. (2015). Secretion systems and signal exchange between nitrogen-fixing rhizobia and legumes. *Frontiers in Plant Science*, *6*, 491.
- Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C., & Sanjuan, J. (2002). *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *15*, 225-232.

- Oldroyd, G. E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology*, *11*, 252-263.
- Oldroyd, G., Murray, J., Poole, P. S., & Downie, J. A. (2011). The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics*, *45*, 119-144.
- Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L. G. P., Ollero, F. J., Nicolás, M. F., Pains Rodrigues, E., *et al.* (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*, 1-26.
- Ormeño-Orrillo, E., Gomes, D. F., del Cerro, P., Vasconcelos, A. T. R., Canchaya, C., Almeida, L. G. P., *et al.* (2016). Genome of *Rhizobium leucaenae* strains CFN 299T and CPAO 29.8: searching for genes related to a successful symbiotic performance under stressful conditions. *BMC Genomics*, *17*, 1-15.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, *5*, e47.
- Patriarca, E. J., Tate, R., Ferraioli, S., & Iaccarino, M. (2004). Organogenesis of legume root nodules. *International Review of Cytology*, *234*, 201-262.
- Peck, M. C., Fisher, R. F., Bliss, R., & Long, S. R. (2013). Isolation and characterization of mutant *Sinorhizobium meliloti* NodD1 proteins with altered responses to luteolin. *Journal of Bacteriology*, *195*, 3714-3723.
- Pellock, B. J., Cheng, H. P., & Walker, G. C. (2000). Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of Bacteriology*, *182*, 4310-4318.
- Pérez-Montaño, F., Jiménez-Guerrero, I., del Cerro, P., Baena-Ropero, I., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., *et al.* (2014). The symbiotic biofilm of *Sinorhizobium fredii* SMH12, necessary for successful colonization and symbiosis of *Glycine max* cv Osumi, is regulated by quorum sensing systems and inducing flavonoids via NodD1. *PLoS One*, *9*, e105901.

- Pérez-Montaño, F., del Cerro, P., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Cubo, M. T., Hungria, M., *et al.* (2016). RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics*, *17*, 1-11.
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *64*, 180-201.
- Phour, M., Sehwat, A., Sindhu, S. S., & Glick, B. R. (2020). Interkingdom signaling in plant-rhizomicrobiome interactions for sustainable agriculture. *Microbiological Research*, *241*, 126589.
- Prinsen, E., Chauvaux, N., Schmidt, J., John, M., Wieneke, U., De Greef, J., & Van Onckelen, H. (1991). Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *FEBS Letters*, *282*, 53-55.
- Poole, P., Ramachandran, V., & Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: from saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*, *16*, 291-303.
- Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2016). Historia de la investigación en la simbiosis leguminosa-bacteria: una perspectiva didáctica. *Arbor*, *192*, a319.
- Renelli, M., Matias, V., Lo, R. Y., & Beveridge, T. J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology*, *150*, 2161-2169.
- Roche, P., Debellé, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., *et al.* (1991). Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: *nodH* and *nodPQ* genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell*, *67*, 1131-1143.
- Rodríguez-López, J., López, A. H., Estrada-Navarrete, G., Sánchez, F., & Díaz-Camino, C. (2019). The noncanonical heat shock protein Pv Nod22 is essential for infection thread progression during rhizobial endosymbiosis in common bean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *32*, 939-948.

- Sartorio, M. G., Pardue, E. J., Feldman, M. F., & Haurat, M. F. (2021). Bacterial outer membrane vesicles: from discovery to applications. *Annual Review of Microbiology*, *75*, 609-630.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., *et al.* (2008). Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Research*, *15*, 227-239.
- Schaper, S., Steinchen, W., Krol, E., Altegoer, F., Skotnicka, D., Sogaard- Andersen, L., *et al.* (2017). AraC-like transcriptional activator CuxR binds c-di-GMP by a PilZ-like mechanism to regulate extracellular polysaccharide production. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*, E4822-E483.
- Schell, M. A. (1993). Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annual Review of Microbiology*, *47*, 597-626.
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature Reviews Microbiology*, *13*, 605-619.
- Seabold, R. R., & Schleif, R. F. (1998). Apo-AraC actively seeks to loop. *Journal of Molecular Biology*, *278*, 529-538.
- Schlaman, H. R., Phillips, D. A., & Kondorosi, E. (1998). Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. En: *The rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria*. Spaink, H. P., Kondorosi, A., Hooykaas, P. J. J. (eds.). Springer, Dordrecht. pp. 361-386. ISBN: 978-94-011-5060-6.
- Shamseldin, A., & Velázquez, E. (2020). The promiscuity of *Phaseolus vulgaris* L. (common bean) for nodulation with rhizobia: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *36*, 1-12.
- Sheoran, S., Kumar, S., Kumar, P., Meena, R. S., & Rakshit, S. (2021). Nitrogen fixation in maize: breeding opportunities. *Theoretical and Applied Genetics*, *134*, 1263-1280.
- Sharma, V., Bhattacharyya, S., Kumar, R., Kumar, A., Ibañez, F., Wang, J., *et al.* (2020). Molecular basis of root nodule symbiosis between *Bradyrhizobium* and 'crack-entry' legume groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Plants*, *9*, 276.

- Shumilina, J., Soboleva, A., Abakumov, E., Shtark, O. Y., Zhukov, V. A., & Frolov, A. (2023). Signaling in legume-rhizobia symbiosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*, 17397.
- Sidhu, V. K., Vorhölter, F. J., Niehaus, K., & Watt, S. A. (2008). Analysis of outer membrane vesicle associated proteins isolated from the plant pathogenic bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *BMC Microbiology*, *8*, 1-16.
- Skorupska, A., Kidaj, D., & Wielbo, J. (2017). Flavonoids and nod factors: importance in legume-microbe interactions and legume improvement. En: *Microbes for Legume Improvement*, Zaidi, A. Khan, M. S. & Musarrat, J. (eds). Springer, Dordrecht. pp.75-94. ISBN: 978-3-319-59173-5
- Solé, M., Scheibner, F., Hoffmeister, A. K., Hartmann, N., Hause, G., Rother, A., *et al.* (2015). *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* secretes proteases and xylanases via the Xps type II secretion system and outer membrane vesicles. *Journal of Bacteriology*, *197*, 2879-2893.
- Soto, M. J., Sanjuan, J., & Olivares, J. (2006). Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology*, *152*, 3167-3174.
- Spaink, H. P. (2000). Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, *54*, 257-288.
- Sprent, J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *The New Phytologist*, *174*, 11-25.
- Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouisni, L. (2020). Exploiting biological nitrogen fixation: a route towards a sustainable agriculture. *Plants*, *9*, 1011.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, *56*, 187-209.
- Sugawara, M., Epstein, B., Badgley, B. D., Unno, T., Xu, L., Reese, J., *et al.* (2013). Comparative genomics of the core and accessory genomes of 48 *Sinorhizobium* strains comprising five genospecies. *Genome Biology*, *14*, 1-20.

- Suzaki, T., Yoro, E., & Kawaguchi, M. (2015). Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *International Review of Cell and Molecular Biology*, *316*, 111-158.
- Taboada, H., Dunn, M. F., Meneses, N., Vargas-Lagunas, C., Buchs, N., Andrade-Domínguez, A., & Encarnación, S. (2019). Qualitative changes in proteins contained in outer membrane vesicles produced by *Rhizobium etli* grown in the presence of the *nod* gene inducer naringenin. *Archives of Microbiology*, *201*, 1173-1194.
- Tashiro, Y., Hasegawa, Y., Shintani, M., Takaki, K., Ohkuma, M., Kimbara, K., & Futamata, H. (2017). Interaction of bacterial membrane vesicles with specific species and their potential for delivery to target cells. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 571.
- 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. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *17*, 1153-1161.
- Tian, L., Liu, L., Xu, S., Deng, R., Wu, P., Jiang, H., *et al.* (2022). A d-pinitol transporter, LjPLT11, regulates plant growth and nodule development in *Lotus japonicus*. *Journal of Experimental Botany*, *73*, 351-365.
- Tilman, D., Balzer, C., Hill, J. & Befort, B. L. (2011). Global food demand and the sustainable intensification of agriculture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*, 20260-20264.
- Toyofuku, M., Cárcamo-Oyarce, G., Yamamoto, T., Eisenstein, F., Hsiao, C. C., Kurosawa, M., *et al.* (2017). Prophage-triggered membrane vesicle formation through peptidoglycan damage in *Bacillus subtilis*. *Nature Communications*, *8*, 481.
- Toyofuku, M., Schild, S., Kaparakis-Liaskos, M., & Eberl, L. (2023). Composition and functions of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 1-16
- Tullio, L. D., Nakatani, A. S., Gomes, D. F., Ollero, F. J., Megías, M., & Hungria, M. (2019). Revealing the roles of *y4wF* and *tidC* genes in *Rhizobium tropici* CIAT 899: biosynthesis of indolic compounds and impact on symbiotic properties. *Archives of Microbiology*, *201*, 171-183.

- Udvardi, M., & Poole, P. S. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology*, *64*, 781-805.
- Van Rhijn, P. J., Feys, B., Verreth, C., & Vanderleyden, J. (1993). Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *Journal of Bacteriology*, *175*, 438-447.
- Vance, C. P. (2002). Root-bacteria interactions: symbiotic N₂ fixation. En: *Plant Roots*. Waisel, Y., Eahel, A., Beeckman, T., & Kafkati U. (eds.). (pp. 1298-1343). CRC Press, Boca Ratón. pp. 1298-1343. ISBN: 9780429221859.
- Velázquez, E., Carro, L., Flores-Félix, J. D., Martínez-Hidalgo, P., Menéndez, E., Ramírez-Bahena, M. H., *et al.* (2017). The legume nodule microbiome: a source of plant growth-promoting bacteria. *Probiotics and Plant Health*, 41-70.
- Vanaja, S. K., Russo, A. J., Behl, B., Banerjee, I., Yankova, M., Deshmukh, S. D., & Rathinam, V. A. (2016). Bacterial outer membrane vesicles mediate cytosolic localization of LPS and caspase-11 activation. *Cell*, *165*, 1106-1119.
- Vlassak, K. M., De Wilde, P., Snoeck, C., Luyten, E., Van Rhijn, P., & Vanderleyden, J. (1998). The *Rhizobium* sp. BR816 *nodD3* gene is regulated by a transcriptional regulator of the AraC/XylS family. *Molecular and General Genetics*, *258*, 558-561.
- Villageliu, D. N. & Samuelson, D. R. (2022). The role of bacterial membrane vesicles in human health and disease. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 828704.
- Vinardell, J. M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., *et al.* (2003). Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *The Plant Cell*, *15*, 2093-2105.
- Vinardell, J. M., López-Baena, F. J., Hidalgo, A., Ollero, F. J., Bellogín, R. A., Espuny, M. R., *et al.* (2004). The effect of FITA mutations on the symbiotic properties of *S. fredii* varies in a chromosomal background-dependent manner. *Archives of Microbiology*, *181*, 144-154.
- Vinardell, J. M., Acosta-Jurado, S., Zehner, S., Göttfert, M., Becker, A., Baena, I., *et al.* (2015). The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: A comparative analysis with *S. fredii*

strains differing in their symbiotic behavior with soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28, 811-824.

Vinuesa, P., Neumann-Silkow, F., Pacios-Bras, C., Spaink, H. P., Martínez-Romero, E. & Werner, D. (2003). Genetic analysis of pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16, 159-168.

Vriezen, J. A., De Bruijn, F. J., & Nusslein, K. (2007). Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 3451-3459.

Walker, L., Lagunas, B., & Gifford, M. L. (2020). Determinants of host range specificity in legume-rhizobia symbiosis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3028.

Weir, B.S. (2016). The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>.

Weston, L. A., & Mathesius, U. (2013). Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *Journal of Chemical Ecology*, 39, 283-297.

Wheatley, R. M., Ford, B. L., Li, L., Aroney, S. T., Knights, H. E., Ledermann, R., *et al.* (2020). Lifestyle adaptations of *Rhizobium* from rhizosphere to symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117, 23823-23834.

Wong, J. E., Gysel, K., Birkefeldt, T. G., Vinther, M., Muszyński, A., Azadi, P., *et al.* (2020). Structural signatures in EPR3 define a unique class of plant carbohydrate receptors. *Nature Communications*, 11, 3797.

Yang, J., Tauschek, M., & Robins-Browne, R. M. (2011). Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. *Trends in Microbiology*, 19, 128-135.