The image shows five glass test tubes arranged horizontally, each containing a young Medicago sativa plant. The plants are submerged in a clear liquid, likely water, which makes their root systems clearly visible. The roots are light-colored and branch out in various directions. The plants have green, trifoliate leaves. The background is dark, making the plants and the liquid in the tubes stand out.

*Efecto del cadmio en la simbiosis de  
Ensifer meliloti y E. medicae con  
Medicago sativa*

Trabajo Fin de Máster

Facultad de Biología

Dulcenombre de Maria del Saz Navarro  
Septiembre 2016



Efecto del cadmio en la simbiosis de *Ensifer meliloti*  
y *E. medicae* con *Medicago sativa*.

Trabajo de Fin de Máster  
Biología Avanzada. Línea Aplicada e Industrial.  
Departamento de Microbiología

Sevilla, 12 de septiembre de 2016

El tutor

El estudiante

M. Rosario Espuny Gómez

María del Saz Navarro

---

## Contenido

Resumen .....	3
Introducción .....	3
Objetivos.....	5
Materiales y Métodos .....	6
Bacterias, medios y condiciones de cultivo .....	6
Ensayos de Movilidad de tipo <i>Swimming</i> .....	7
Tolerancia a Sustancias antimicrobianas .....	7
Ensayo para la determinación de la producción de moléculas implicadas en <i>quorum sensing</i> .....	7
Estudio de la producción de polisacáridos extracelulares .....	8
Estudios con <i>M. sativa</i> en condiciones controladas.....	8
Ensayo de competitividad mediante detección del gen <i>GusA</i> , en plantas de alfalfa.....	9
Resultados.....	10
Caracterización de los rizobios <i>E. medicae</i> SVQ748 y <i>E. meliloti</i> Rm2011 y sus derivados.....	10
Efecto del cadmio sobre la simbiosis de <i>E. medicae</i> SVQ748 y <i>E. meliloti</i> 2011 y sus derivados en alfalfa.....	13
Competitividad por la nodulación de <i>E. meliloti</i> 2011 y sus derivados en alfalfa.....	17
Discusión .....	17
Agradecimientos .....	19
Bibliografía .....	19

Foto de portada: Plantas de un ensayo de este trabajo.

Autor: Luis Manuel Osuna Cascajosa.

## Resumen

En este trabajo se pretende conocer el efecto del cadmio sobre la simbiosis que establecen *E. medicae* SVQ748 y *E. meliloti* Rm2011 con *M. sativa*, así como el papel de los genes *nolG* y *nolF*, pertenecientes a la familia RND de bombas de expulsión de metales pesados y otras sustancias antimicrobianas, en la tolerancia frente a éstas y en la simbiosis en ausencia y presencia de cadmio. Para ello se han estudiado las resistencias que presentan dichas bacterias y sus respectivos mutantes en los genes *nolG* y *nolF* a metales pesados, antimicrobianos y antibióticos; se han analizado comparativamente la movilidad de tipo *swimming*, la producción de polisacáridos extracelulares y de moléculas implicadas en *quorum sensing*. Además, se ha investigado cómo afectan las mutaciones en *nolG* y *nolF* en la cinética, la competitividad y la eficiencia de la nodulación de *M. sativa* en ausencia y en presencia de cadmio.

Los resultados obtenidos permiten concluir que los genes *nolG* y *nolF* no parecen intervenir en la resistencia a las sustancias tóxicas usadas pero sí tienen un papel en la simbiosis.

## Introducción

Los rizobios son bacterias Gram negativas pertenecientes a las  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -*proteobacteria*, que en ausencia de nitrógeno combinado pueden fijar nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) en simbiosis con plantas leguminosas. Entre sus leguminosas hospedadoras se encuentran un gran número de plantas de interés comercial como la judía, la soja, etc. En esta asociación, la bacteria induce en la planta el desarrollo de un nuevo órgano, el nódulo, en cuyo interior se produce la fijación biológica del N<sub>2</sub> (FBN)[1,2].

La interacción comienza con un diálogo molecular entre la planta y el rizobio que conlleva la expresión coordinada de un gran número de genes[3–5]. La formación del nódulo implica un reconocimiento específico entre la bacteria y la planta, la invasión de las células de la planta por la bacteria y otros cambios en la estructura y bioquímica de ambos organismos[2].

Los rizobios son atraídos específicamente y crecen en la rizosfera, estimulados por compuestos exudados por la raíz, tanto nutrientes como flavonoides, compuestos polifenólicos. Cada planta secreta una serie de flavonoides que inducen la expresión en el rizobio compatible de genes esenciales en el proceso de nodulación: genes *nod*, *nol* y *noe*[6]. Estos genes, localizados generalmente en el plásmido simbiótico son los encargados de la síntesis de una serie de moléculas señal, los lipo-quitto-oligosacáridos (LCO) o factores Nod. Todas las especies de rizobios producen factores Nod con la misma estructura básica: un esqueleto oligosacárido constituido por 4-5 restos de N-acetilglucosamina, sustituido en su extremo no reductor por un ácido graso. Además, cada especie de rizobio produce un conjunto de factores Nod con diferentes sustituciones que determinan qué leguminosas pueden nodular[7,8]. Junto los factores Nod, el reconocimiento del rizobio por la planta se produce a través de moléculas superficiales, como los polisacáridos  $\beta$ -glucanos cíclicos, los lipopolisacáridos, los exopolisacáridos (EPS) y los polisacáridos capsulares tipo antígeno-K[9,10] que permiten la entrada en las células de la raíz, crucial para el desarrollo del nódulo fijador[2,11].

Una vez iniciado el diálogo molecular, las bacterias colonizan la superficie de la raíz e inducen la curvatura del pelo radical[12] y la invaginación de la membrana plasmática del pelo radical generando el tubo de infección. Simultáneamente se activa el ciclo celular de las células del córtex de la raíz y cuando el tubo de infección alcanza las células del primordio, las

bacterias son liberadas al citoplasma de éstas rodeadas por una membrana peribacteroidea derivada de la membrana celular vegetal. Finalmente las bacterias se diferencian a bacteroides responsables de la FBN y el primordio nodular a nódulo maduro. La planta proporciona a la bacteria nutrientes y el ambiente microaeróbico necesario para la FBN.

Las bacterias pueden producir y detectar señales permitiendo a toda una población iniciar una actividad concreta al alcanzar una concentración crítica de células, fenómeno conocido como *quorum sensing* (QS). En bacterias Gram negativas, las moléculas señal de *quorum* más utilizadas son las N-acil homoserina lactonas (AHL). Los genes regulados por QS están implicados en cambios adaptativos de las poblaciones bacterianas modificando su comportamiento al alcanzar una cierta densidad celular[13]. Los genes controlados por QS regulan procesos como la transferencia de plásmidos, producción de toxinas, inhibición del crecimiento, adaptación a la fase estacionaria, formación de biopelículas, producción de EPS, movilidad, eficiencia en la nodulación, desarrollo del simbiosoma y FBN que son esenciales para un establecimiento exitoso de la simbiosis o de la relación patogénica con hospedadores eucariotas[14,15].

El *swimming* es un movimiento dependiente de flagelos que se da en medios acuosos y en superficies que presentan un fluido sobre ellas y se caracteriza por un patrón de movimiento bacteriano desorganizado[16]. La movilidad confiere a las bacterias mayor eficacia en obtención de nutrientes, acceder a mejores nichos, evitar el efecto de sustancias tóxicas o una mejor dispersión bacteriana en el medio ambiente.

La FBN está fuertemente influida por el estado fisiológico de la planta, por ello, un rizobio persistente y competitivo no desarrolla su capacidad real de FBN si existen factores limitantes o estresantes[17] como déficit hídrico, presencia de metales pesados, salinidad o altas temperaturas. Muchos metales son esenciales para el crecimiento de los organismos pero otros pueden ser perjudiciales como el Cs, Al, y Cd que no tienen una función esencial conocida y se pueden acumular. Las plantas presentan mecanismos intrínsecos de respuesta al estrés por metales pesados a través de quelantes metálicos formando fitoquelatinas y complejos metálicos de metalotioneínas y su posterior eliminación. Igualmente, las bacterias utilizan diversos mecanismos para protegerse de los metales pesados: transformaciones redox, producción de péptidos y proteínas de unión, precipitación orgánica e inorgánica, transporte activo, flujo y compartimentalización celular. Además, las paredes celulares y otras estructuras presentan la capacidad de unir metales. Entre los mecanismos de bombeo se encuentran, la superfamilia de proteínas RND (resistencia-nodulación-división celular), la familia CDF (facilitadora de la difusión de los cationes) y las ATPasas tipo P.

La gran superfamilia de bombas de ATP están implicadas en el transporte de metales a través de las membranas celulares en contra de gradiente de concentración para mantener una concentración constante y no tóxica dentro del citoplasma[18]. El transporte mediado por CDF se impulsa por un gradiente de concentración, un gradiente osmótico, potencial hídrico, potencial de pH o un gradiente de potasio[19,20]. La superfamilia RND son proteínas implicadas en el transporte de metales pesados, en la nodulación de leguminosas y en la división celular. Dentro de esta superfamilia se encuentran la familia HME-RND (eflujo de metales pesados) y la familia HAE-RND, (eflujo de compuestos hidrófobos y anfipáticos). Normalmente adyacente al gen que codifica las proteínas RND se encuentra un gen que codifica una proteína de la familia MFP (proteínas de fusión a membrana). Además, muchas proteínas

RND cooperan con una tercera proteína de la familia de las OMF (factores de membrana externa). Juntas, estas tres proteínas forman un complejo que permite el paso de iones desde la membrana citoplasmática, el citoplasma o del periplasma hacia el exterior pasando por la membrana externa.

*E. meliloti* Rm2011 presenta un operón constituido por los genes *nodM**nodF**nodN* bajo un promotor inducible por flavonoides (*nodbox*), importante para una nodulación eficiente de la alfalfa[21]. *NodM* tiene homología con una glucosamina sintetasa y mutaciones en *nodM* o *nodN* tienen efecto en la nodulación dependiendo de la planta. Además, un mutante en *nodM* de *E. meliloti* producía menos factores de nodulación aunque no presentaba cambios en su estructura, desarrollaba nódulos tardíos y menos eficientes fijando nitrógeno y el desarrollo de los bacteroides de este mutante estaba afectado. El análisis *in silico* de *nolFG* sugiere que codifican una bomba de tipo RND, donde *NolG* constituye el transportador de membrana interna y *NolF* la MFP que conecta el transportador con el tercer componente del sistema, una proteína localizada en la membrana externa u OMF codificada por un gen que no está ligado a *nolFG*. La función durante la simbiosis de la bomba codificada por los genes *nolFG* no está clara y tampoco están establecidos los sustratos que transporta.

En *E. meliloti* AK631 se pensaba que *NolFG* están involucrados en la nodulación, dado que mutantes por inserción de Tn5 en cualquiera de estos genes presentaban retraso y una reducción del número de nódulos en alfalfa[21]. Más tarde, se sugirió que la inserción de Tn5 en los genes *nolFG* no disminuyó los niveles de transcripción del gen corriente abajo, *nodN*, que codifica una proteína necesaria para la producción eficiente de factores Nod[22]. Más recientemente, la mutación por delección en *nolG*[23], no alteró el fenotipo simbiótico, por lo que es probable que las mutaciones causadas por Tn5 en los genes *NolFG* ocasionaran un efecto polar sobre la expresión del gen *nodN* y que éste fuera el causante del fenotipo de nodulación.

Algunos autores[24] sugieren que el sistema RND codificado por los genes *nolFG* pudiera transportar factores Nod[24], mientras que otros[25] no encuentran evidencias experimentales sobre ese papel y proponen que *nolG* podría estar implicado en la expulsión de antibióticos o desoxicolato, más que en el proceso simbiótico rizobio-leguminosa[25].

## Objetivos

Con estos antecedentes, los objetivos marcados son el estudio de los efectos de la mutación de los genes *nolG* y *nolF* de la familia RND de *E. meliloti* Rm2011 y *E. medicae* SVQ748 en:

1. La resistencia a metales pesados y a antimicrobianos.
2. La producción de moléculas implicadas en *quorum sensing*.
3. La movilidad tipo *swimming*.
4. La producción de polisacáridos extracelulares.
5. La cinética y la competitividad por la nodulación en plantas de *M. sativa*.

## Materiales y Métodos

### Bacterias, medios y condiciones de cultivo

Las bacterias utilizadas se recogen en la Tabla 1 y se cultivaron en los medios detallados en la Tabla 2 a una temperatura de 28°C y un pH de 6,8-7,0. Los medios se esterilizaron en autoclave 20 minutos a 1 atmosfera de sobrepresión (121°C). Cuando fue necesario se utilizaron los antibióticos mostrados en la Tabla 3.

**Tabla 1.** Estirpes bacterianas utilizadas en este trabajo.

<i>Ensifer meliloti</i>		
Estirpe	Características relevantes	Referencia
Rm2011	Mutante espontáneo estreptomycin resistente derivado de SU47 (Antes Sm2011).	[26]
Rm2011 NolG	Rm 2011 mTn5STM.1.07.H05 SMa0875 NolG efflux transporter, Sm <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> gusA.	[27]
Rm2011 NolF	Rm2011 mTn5STM.2.05.C02 SMa0876 NolF secretion protein. Sm <sup>R</sup> Km <sup>R</sup> gusA.	[27]
<i>Ensifer medicae</i>		
Estirpe	Características relevantes	Referencia
SF3.41	Estirpe silvestre.	[28]
SVQ748	Mutante espontáneo rifampicina resistente derivado de SF3.41	[29]
SVQ750	SVQ 748 mutado en el gen <i>nolG</i> por inserción del casete <i>lacZ-Gm</i>	[29]
SVQ758	SVQ748 mutado en el gen <i>nolG</i> por delección en fase.	[29]

La estirpe silvestre Rm2011 a partir de ahora se nombrará como 2011 y los mutantes Rm2011 NolF a partir de ahora se nombrará como 2011NolF y Rm2011 NolG a partir de ahora se nombrará como 2011NolG.

**Tabla 2.** Medios de cultivo empleados para el crecimiento de las bacterias.

<b>Medio TY[30]</b>	
Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0,65 g
H <sub>2</sub> O destilada	Completar hasta 1 L
<b>Medio YM[31]</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,2 g
Extracto de levadura	0,1 g
Manitol	10/3 g*
H <sub>2</sub> O destilada	Completar hasta 1 L
* 10 g para una solución YM (10) y 3g para una solución YM (3).	
<b>Medio Bromfield</b>	
Extracto de levadura	0,4 g
Triptona	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,1 g
Agar bacteriológico	3 g
H <sub>2</sub> O destilada	Completar hasta 1 L

**Tabla 3.** Antibióticos empleados para la selección de las bacterias.

Agente selectivo	<i>E. meliloti</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )		<i>E. medicae</i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Placa	Líquido	Placa	Líquido
Estreptomicina (Spc)		400		400
Gentamicina (Gm)	25	12,5	50	12,5
Kanamicina (Km)		60		30
Rifampicina (Rif)		50		50

La rifampicina se disolvió en metanol, la tetraciclina en etanol al 70% y el ácido nalidíxico en una solución NaOH 0,1 M. Los demás antibióticos se disolvieron en agua. La temperatura de almacenamiento de los antibióticos fue de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Ensayos de Movilidad de tipo *Swimming*

Se colocaron alícuotas de  $3\ \mu\text{L}$  de cultivo bacteriano en TY líquido (D.O.<sub>600 nm</sub> de 0,9-1) introduciendo la punta de una micropipeta hasta la mitad del grosor de placas con medio Bromfield (0,3% de agar), suplementado o no con el flavonoide inductor luteolina ( $1\ \mu\text{g/mL}$ ), se incubaron 6 días y se midió el diámetro de la colonia. Los resultados obtenidos de un mínimo de dos experimentos independientes (con al menos 3 réplicas técnicas), se les aplicó la desviación estándar.

### Tolerancia a Sustancias antimicrobianas

La resistencia a metales pesados, antibióticos y sustancias bacterianas se analizó mediante el método de difusión en disco de Kirby-Bauer[32]. Para ello, se inocularon 2 mL de cultivo (D.O.<sub>600 nm</sub> 0,6) de la bacteria en 25 mL de medio TY (1% agar) templado. Una vez solidificado, se colocaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro a los que se añadieron  $5\ \mu\text{L}$  de diferentes concentraciones de las sustancias a ensayar (Tabla 4). Las placas se incubaron 2 días y se midieron los diámetros (mm) de las zonas de inhibición.

**Tabla 4.** Sustancias antimicrobianas.

Metales	Antibióticos	Sust. Antimicrobianas
$\text{CdCl}_2$ 100 mM	Ciprofloxacino 25	Agua oxigenada 30%
$\text{CoCl}_2$ 100 mM	Desoxicolato 0,5 g/mL	Luteonina 5 mg/mL
$\text{CuSO}_4$ 500 mM	Novobiocina 75	Metanol
$\text{NiCl}_2$ 200 mM	Rifampicina 25	Naringenina 5 mg/mL
$\text{ZnSO}_4$ 500 mM	Piperacilina 10	SDS 20%

### Ensayo para la determinación de la producción de moléculas implicadas en *quorum sensing*

Se realizaron ensayos de difusión en placa de Petri usando al biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) curada del plásmido pTiC58 y que porta el plásmido pZRL4 con la fusión *traG::lacZ* y del gen *traR*,  $\text{Gm}^{\text{R}}$  [33]. Se colocaron cilindros metálicos estériles (0,8 cm de diámetro y 1 cm de altura) en las placas sobre las que se añadió medio YMA(3). Una vez solidificado se añadieron a cada placa 4 mL de agar de cobertera con  $400\ \mu\text{L}$  de cultivo en fase estacionaria del biosensor y  $40\ \mu\text{L}$  de X-Gal (20 mg/mL). Tras solidificarse se retiraron los cilindros metálicos y en cada pocillo se añadieron  $200\ \mu\text{L}$  de los sobrenadantes bacterianos obtenidos previamente mediante centrifugación a partir de cultivos de 5-6 días en medio YM3.



Las placas se incubaron 48 horas y se midieron los halos desarrollados. Para la extracción, sobrenadantes de las bacterias crecidas 6 días en 5 mL de medio YM(3) se extrajeron con un volumen de acetato de etilo acidificado (0,1% de ácido acético glacial), se evaporaron hasta sequedad y se resuspendieron en un volumen adecuado del mismo solvente (aproximadamente 10  $\mu\text{L}/\text{mL}$  de sobrenadante).

El análisis se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) en placas de silica gel 60 RP-18 F<sub>254S</sub> (1.05559 Merck) usando 4  $\mu\text{L}$  de una concentración de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de los patrones: hexanoil homoserina lactona (HHL) y octanoil homoserina lactona (OHL). Se usó metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Finalmente, se dejó para evaporar el solvente. Las placas fueron reveladas con una mezcla de 20 mL de YM(3) 1,2% de agar, 10 mL de cultivo *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) en fase estacionaria y 40  $\mu\text{L}$  de X-Gal (40 mg/mL), que se vertió sobre la placa TLC previamente colocada en placas de Petri cuadradas. Se incubaron 48 horas o hasta la aparición de las manchas correspondientes[33].

### Estudio de la producción de polisacáridos extracelulares

Se colocaron 3  $\mu\text{L}$  del cultivo en TY líquido de las bacterias ( $\text{D.O.}_{600\text{ nm}}$  0,9~1) en la superficie de placas de YMA(10), suplementado o no con el flavonoide inductor luteolina (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y calcoflúor (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Tras incubar 6 días, se midió el diámetro de la colonia y, cuando contenían calcoflúor, se observaron bajo luz UV. Se realizaron un mínimo de dos experimentos independientes (con al menos 3 réplicas técnicas) y se les aplicó la desviación estándar.

### Estudios con *M. sativa* en condiciones controladas

Las plantas se cultivaron en la cámara de plantas con una intensidad lumínica de  $500\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$  ( $\lambda = 400\sim 700\text{ nm}$ ), fotoperiodo 16/8 horas luz/oscuridad, temperatura de 24/18°C día/noche y humedad relativa de un 50%. Se utilizó la solución de Rigaud-Puppo carente de nitrógeno combinado y diluida a la mitad (0,5x). Cuando fue necesario se añadió el volumen adecuado de una solución concentrada y esterilizada mediante filtración de  $\text{CdCl}_2$  hasta conseguir las concentraciones finales deseadas.

#### Solución de Rigaud-Puppo (1x)[34]

$\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0,2 g
$\text{SO}_4\text{K}_2$	0,2 g
$\text{SO}_4\text{Mg}7\text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{Cl}_2\text{Ca}2\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
Solución de Gibson	1 mL
Quelante de Hierro	0,02 g
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	Completar hasta 1 L
Agar	0,7 %

El pH del medio se ajustó a 6,5-7,0 y posteriormente se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

#### Solución de micronutrientes de Gibson

$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,86 g
$\text{MnSO}_4 \text{H}_2\text{O}$	2,08 g
$\text{ZnSO}_4 7\text{H}_2\text{O}$	0,22 g
$\text{CuSO}_4 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	0,13
$\text{H}_2\text{O}$ destilada	Completar hasta 1L

Las semillas se desinfectaron con etanol de 96° (30 segundos), seguido de hipoclorito sódico al 6% (m/v) (15 minutos) y 6 lavados con agua destilada estéril y durante el último lavado se dejaron en oscuridad 20 minutos. Para su germinación, se colocaron en placas con agar-agua al 0,8% (m/v) y se incubaron en oscuridad a 28°C.

El cultivo se realizó en tubos de 18 mm o 60 mm de diámetro, que contenían solución de Rigaud-Puppo 0,5x solidificados con agar (0,8%) e inclinados tras su esterilización en autoclave. En cada tubo se colocaron dos plántulas y se inocularon con cultivo bacteriano crecido en medio YM (400 µL o 50 µL en tubo grande o tubo pequeño respectivamente).

En los ensayos de cinética de la nodulación las raíces fueron inspeccionadas a intervalos de tiempo regulares durante aproximadamente un mes para observar el desarrollo de los nódulos. Finalmente, las partes aéreas fueron separadas de la raíz y se secaron en una estufa (J.P. Selecta, España) a 80°C durante 48 horas, tras lo que se dejaron otras 24 horas con el horno apagado para finalmente ser pesadas.

### Ensayo de competitividad mediante detección del gen *GusA*, en plantas de alfalfa

El número de nódulos que una cepa es capaz de formar en presencia de otra se evaluó utilizando cepas marcadas con el gen informador *gusA* ( $\beta$ -glucoronidasa). Se utilizaron tubos de vidrio (18 mm de diámetro) en los que se colocó una tira de papel de filtro y se añadieron 5 mL de Rigaud-Puppo, se autoclavaron a 121°C durante 20 minutos. En cada tubo se colocó una plántula de alfalfa y se mantuvieron 48 horas a temperatura ambiente y oscuridad. Posteriormente, la parte inferior de los tubos se envolvió en papel opaco y se cultivaron en la cámara de plantas durante 7 días, tras lo que cada planta fue inoculada con 500 µL de una suspensión de  $1 \times 10^6$  células/mL que contenía en proporción 1:1 una mezcla de la cepa silvestre o la cepa de estudio, con la cepa marcada con el gen *gusA* ( $\beta$ -glucoronidasa). 15 días después se cortaron las raíces, se aclararon con agua destilada entre 10–15 minutos y se mantuvieron sumergidas en 5 mL de una solución de X-Gluc, Thermo Scientific, (21 mg/40 mL) en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7 y SDS al 1%, durante 20-22 horas a 37°C en oscuridad. Los nódulos que contenían la cepa marcada con *gusA* o estaban ocupados por ambas cepas aparecieron teñidos de azul, mientras que aquellos ocupados exclusivamente por la cepa de interés permanecieron blancos.

#### Tampón Fosfato Sódico

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (100 mM)	14,4 mL
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (100 mM)	10,6 mL
SDS 10%	5 mL
H <sub>2</sub> O destilada	25 mL
X-Glu c	26,25 mg

## Resultados

### Caracterización de los rizobios *E. medicae* SVQ748 y *E. meliloti* Rm2011 y sus derivados

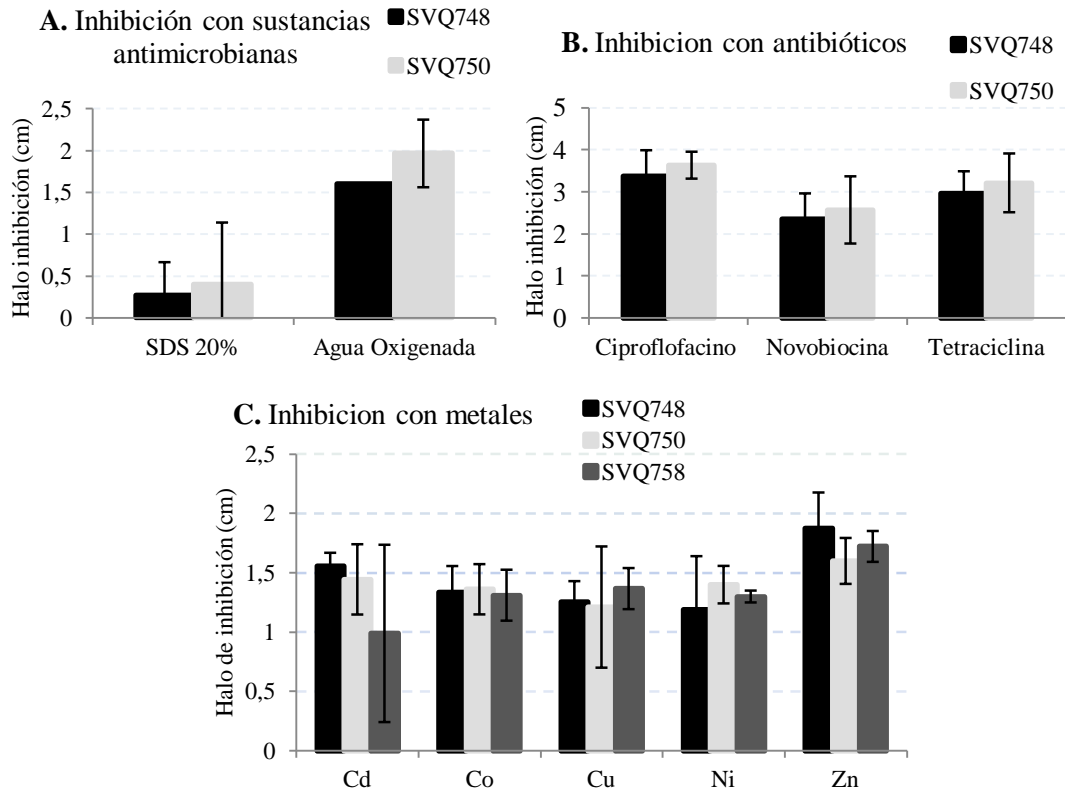
Para conocer la implicación de los genes *nolG* y *nolF* en algunas características de estos rizobios se realizaron estudios de inhibición del crecimiento por sustancias antimicrobianas y metales pesados y de producción de AHL, polisacáridos extracelulares así como su movilidad tipo *swimming*.

En primer lugar, se emplearon los metales pesados CdCl<sub>2</sub> y CoCl<sub>2</sub> (100 mM), NiCl<sub>2</sub> (200 mM), ZnSO<sub>4</sub> y CuSO<sub>4</sub> (500 mM), las sustancias antibacterianas como el SDS (20%), agua oxigenada (30%), metanol, desoxicolato sódico (5 mg/mL) y los flavonoides luteolina y naringenina (5 mg/mL); los antibióticos ciprofloxacino (25 mg/mL), novobiocina (75 mg/mL), piperacilina (75 mg/mL), rifampicina (25 mg/mL) y tetraciclina (10 mg/mL).

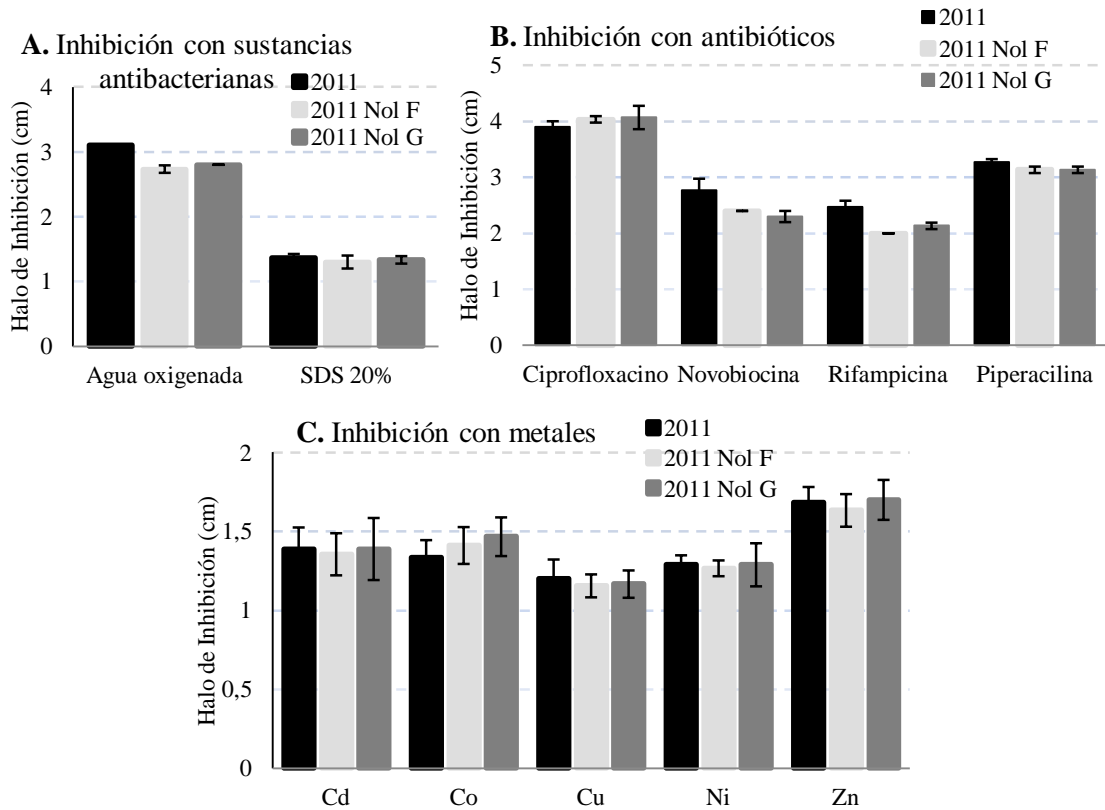
Los resultados obtenidos con *E. medicae* SVQ748 mostraron que no había diferencias significativas entre el grado de tolerancia de los mutantes en *nolG* por inserción (SVQ750) y por delección (SVQ758) frente al silvestre con ninguna de las sustancias empleadas (Figura 1); además, algunas sustancias no provocaron inhibición (metanol, desoxicolato sódico, luteolina, naringenina, piperacilina y rifampicina). Tampoco se encontraron diferencias significativas en los mutantes por inserción en *nolF* y *nolG* de *E. meliloti* Rm2011. Así como que el metanol, desoxicolato sódico y los flavonoides y la tetraciclina no inhibieron a ninguna de estas bacterias (Figura 2).

Todos los rizobios produjeron moléculas del tipo acil homoserina lactonas (AHL) (Figura 3). Pero mientras que Rm2011 y sus derivados las produjeron a baja concentración (no fueron detectadas en los ensayos de difusión en placas), SVQ748 y derivados lo hicieron en mayores cantidades. Rm2011 y derivados produjeron dos moléculas distintas, siendo el mutante por inserción en *nolF* el que menos produjo. SVQ748 y derivados produjeron al menos seis moléculas distintas, siendo en este caso el SVQ758 con menor producción (Figura 3). Para determinar las diferencias morfológicas de las colonias y en la producción de polisacáridos se emplearon placas YMA(10) más luteolina (lut) con y sin calcofluor (cal), para ver si la presencia de luteolina afectaba a la producción de polisacáridos (Figura 4). Rm2011 y derivados presentaron el mismo aspecto mucoso y fluorescente sin sufrir cambios por la adición de luteolina. Sin embargo, los mutantes en *nolG* de *E. medicae* SVQ750 y SVQ758 presentaron diferencias morfológicas en YMA(10) tanto en ausencia como en presencia de luteolina frente a su parental SVQ748, más pronunciadas en SVQ750. Además, en ausencia de luteolina SVQ750 fue el único que mostró fluorescencia, aunque cuando se añadió luteolina las tres cepas fluorescieron.

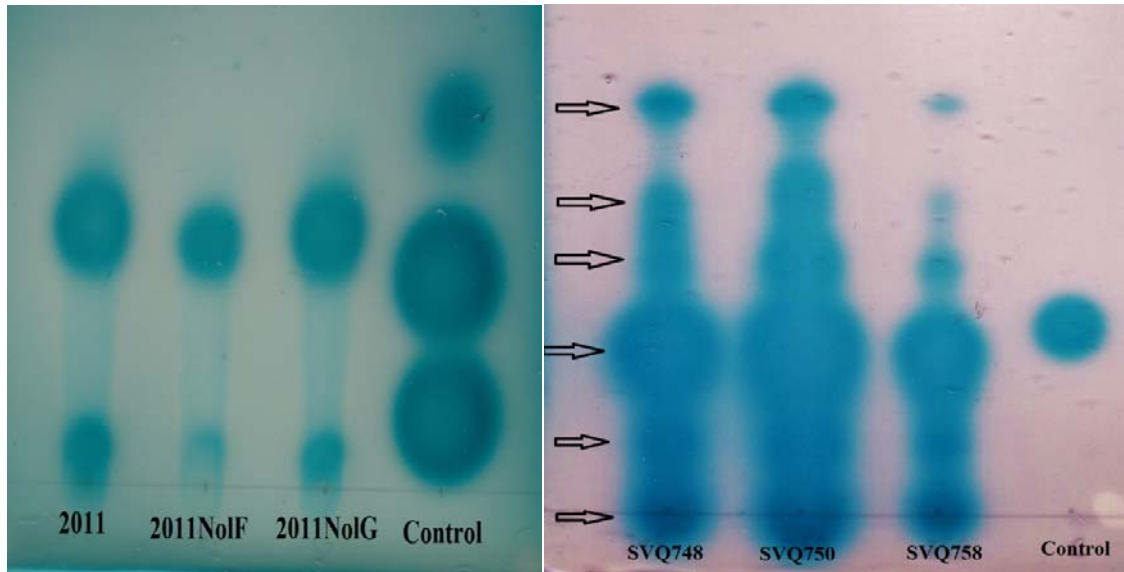
En la movilidad tipo *swimming* de *E. meliloti* (Figura 5) se detectó una disminución significativa de 2011NolF frente a 2011. La presencia de luteolina disminuyó significativamente la movilidad en todas las cepas y, además, 2011NolG fue significativamente más móvil que 2011 y 2011NolF en estas condiciones.



**Figura 1.** Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento en las estirpes *E. medicae*: SVQ748 silvestre, SVQ750 mutante y SVQ758 mutante. En presencia de **A.** Sustancias antimicrobianas, **B.** Antibióticos y **C.** Metales.

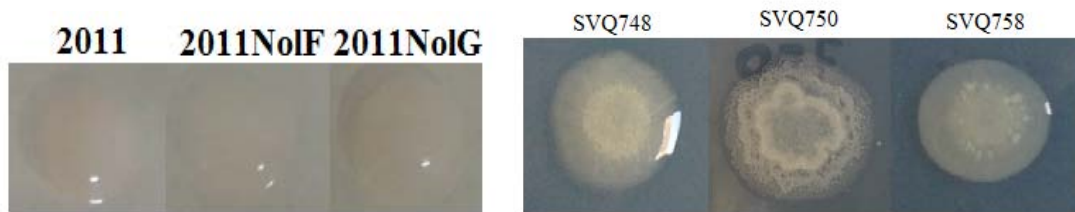


**Figura 2.** Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento en las estirpes *E. meliloti*: 2011 silvestre, 2011NoIF mutante y 2011NoIG mutante. En presencia de **A.** Sustancias antibacterianas, **B.** Antibióticos y **C.** Metales.

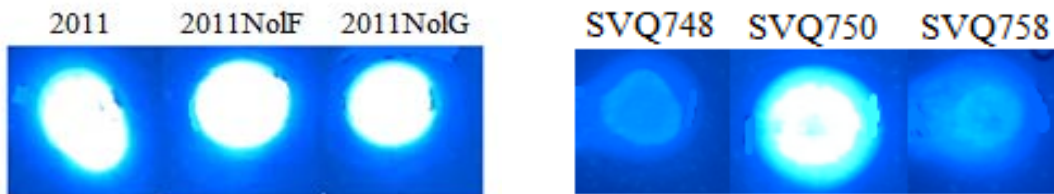


**Figura 3.** Producción de AHL de *E. meliloti* 2011, 2011NoIF y 2011NoIG (derecha) y *E. medicae* SVQ748, SVQ750 y SVQ758 (izquierda).

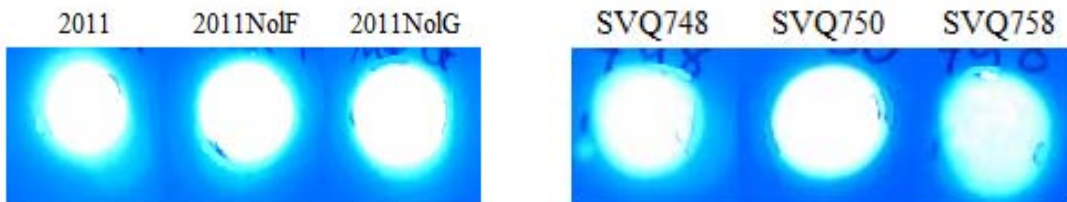
**A. YMA(10)**



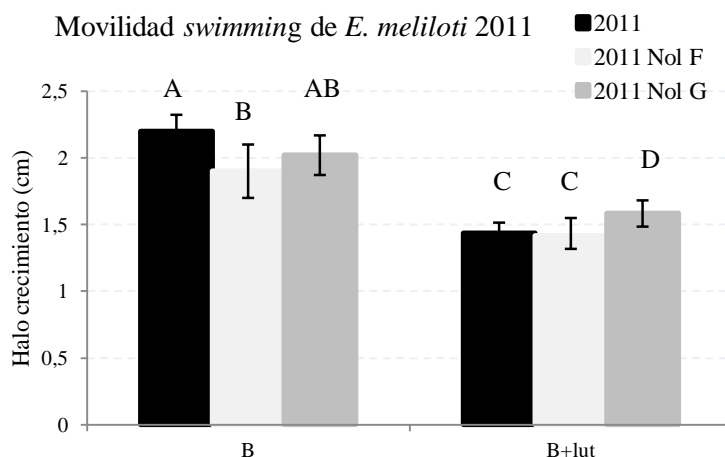
**B. YMA(10) + calcoflúor**



**C. YMA(10) + calcoflúor + luteolina**



**Figura 4.** Diferencias morfológicas en colonias de **A.** *E. medicae* y diferencia en la producción de polisacáridos tanto en **B.** ausencia como en **C.** presencia de luteolina.



**Figura 5.** Movilidad tipo *swimming* en medio Bromfield 0,3 de agar, de *E. meliloti* en ausencia (B) y en presencia de luteolina (B+lut). Las letras representan diferencias significativas (las columnas con la misma letra no difieren significativamente) con  $p < 0,005$ .

### Efecto del cadmio sobre la simbiosis de *E. medicae* SVQ748 y *E. meliloti* 2011 y sus derivados en alfalfa

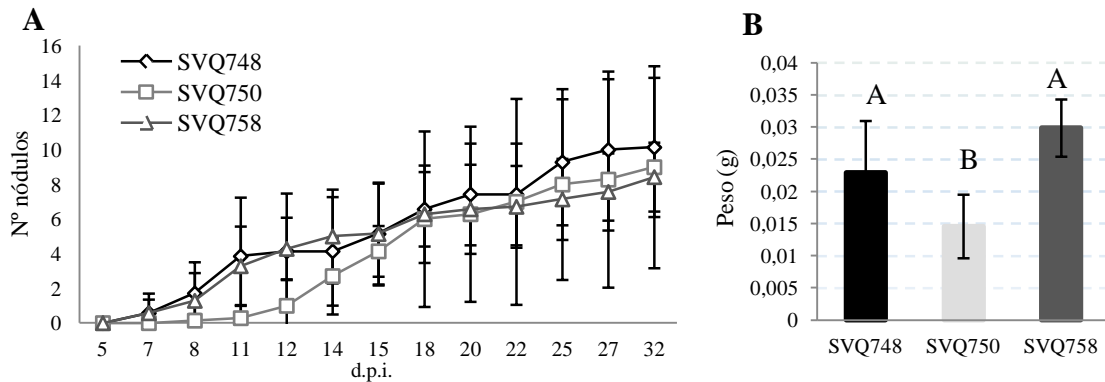
Se realizaron ensayos de toxicidad frente a  $\text{CdCl}_2$  para comprobar qué concentración producía un efecto negativo sobre la planta sin que afectara demasiado al crecimiento radical. Se utilizaron las concentraciones 0,5, 0,7, 1, 10, 15 y 25 mg/L. Finalmente, se seleccionaron las concentraciones 0,5 y 0,7 mg/L, ya que ambas afectaban al desarrollo normal de la planta, pero permitían la formación de los nódulos. Además, se realizaron curvas de crecimiento de 2011 y sus derivados en medio YMB con las mismas concentraciones de cadmio observándose que no afectaba significativamente al crecimiento de ninguna de ellas.

Para conocer el efecto del  $\text{CdCl}_2$  sobre la cinética de nodulación se realizaron ensayos en ausencia y con 0,5 y 0,7 mg/L en tubos grandes y pequeños. En ausencia de  $\text{CdCl}_2$ , las plantas inoculadas con SVQ750 mostraron un menor número de nódulos que las inoculadas con SVQ748 y SVQ758 en todos los puntos analizados. Además, se apreció un retraso en la nodulación en SVQ750 (11 d.p.i.) frente a SVQ748 y SVQ758 (7 d.p.i.) (Figura 6A). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas a los días 11 entre SVQ750 y SVQ 748 y a los 12 entre SVQ750 y SVQ758, con un valor de  $p < 0,005$ . Además, hubo una disminución en la masa seca de la parte aérea en las plantas inoculadas con SVQ750 frente a las inoculadas con SVQ748 y SVQ758 (Figura 6B). Siendo SVQ758 el que provocó un crecimiento mayor de la parte aérea (Figura 10).

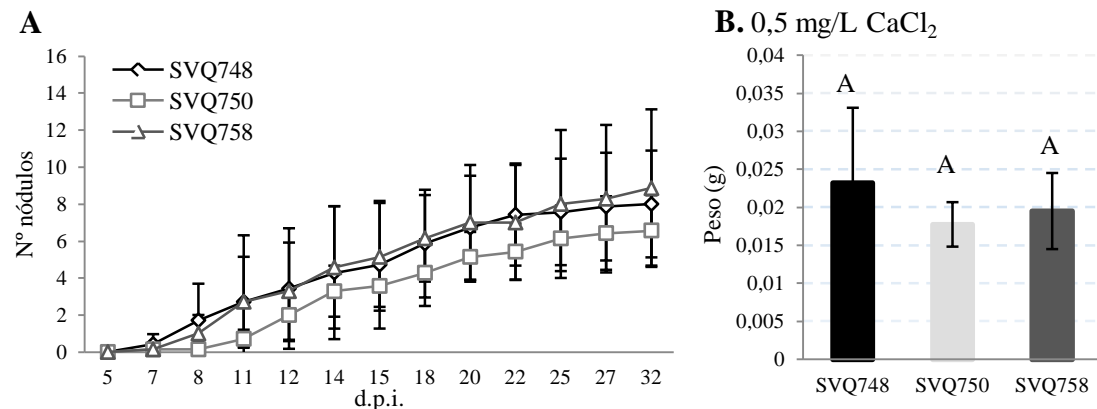
A 0,5 mg/L de  $\text{CdCl}_2$  se observó algo similar, las plantas inoculadas con SVQ750 desarrollaron menos nódulos y retrasados (11 d.p.i.) que con SVQ748 y SVQ758 en todos los puntos (Figura 7A). Además, se detectó una ligera disminución no significativa en la masa seca de la parte aérea de las plantas inoculadas con ambos mutantes (Figuras 7B y 10). A 0,7 mg/L de  $\text{CdCl}_2$ , SVQ750 y SVQ758 desarrollaron un mayor número de nódulos y más tempranos (7 d.p.i.) que SVQ748 en todos los puntos (Figura 8A). No se observaron diferencias significativas en el peso seco de la parte aérea de las plantas (Figura 8B y 10).

La cinética de nodulación del silvestre SVQ748 en las diferentes concentraciones de cadmio (Figura 9A) mostró una disminución significativa en el número de nódulos

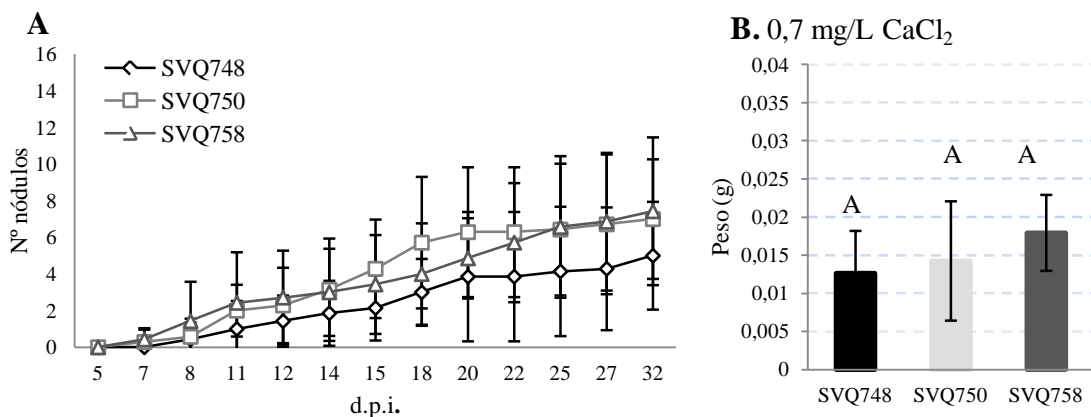
desarrollados a partir del día 18 a 0,7 mg/L de CdCl<sub>2</sub>. Estas diferencias no se observaron en los casos de los mutantes (Figuras 9B y 9C).



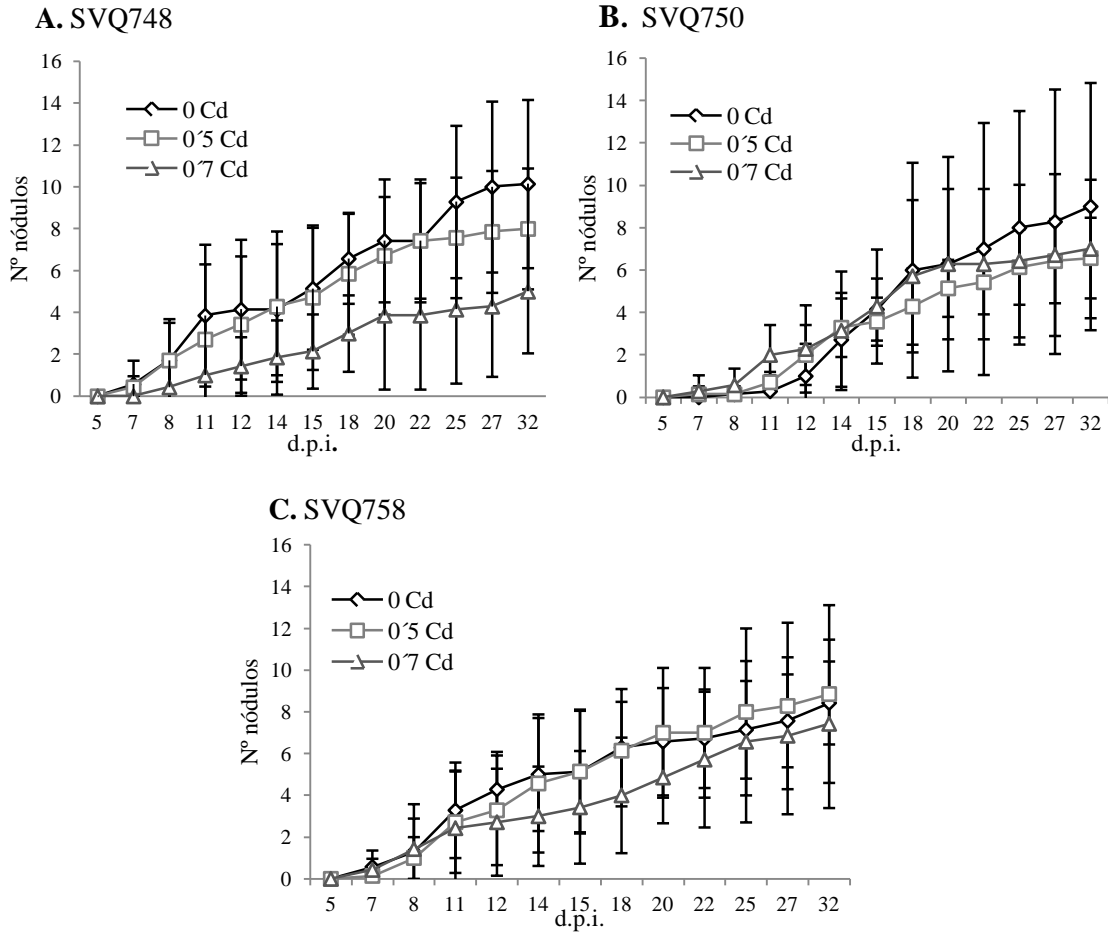
**Figura 6.** Cinética de nodulación de alfalfa inoculada con SVQ748, SVQ750 y SVQ758 en ausencia de CdCl<sub>2</sub>. **A.** Cinética de la Nodulación. **B.** Peso seco de la parte aérea de la planta a los 32 d.p.i. Los datos representan la media de 7 réplicas cada una con dos plantas. Los valores de los mutantes SVQ750 y SVQ758 se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test ANOVA de un factor. Las letras representan diferencias significativas a una  $p < 0,05$ .



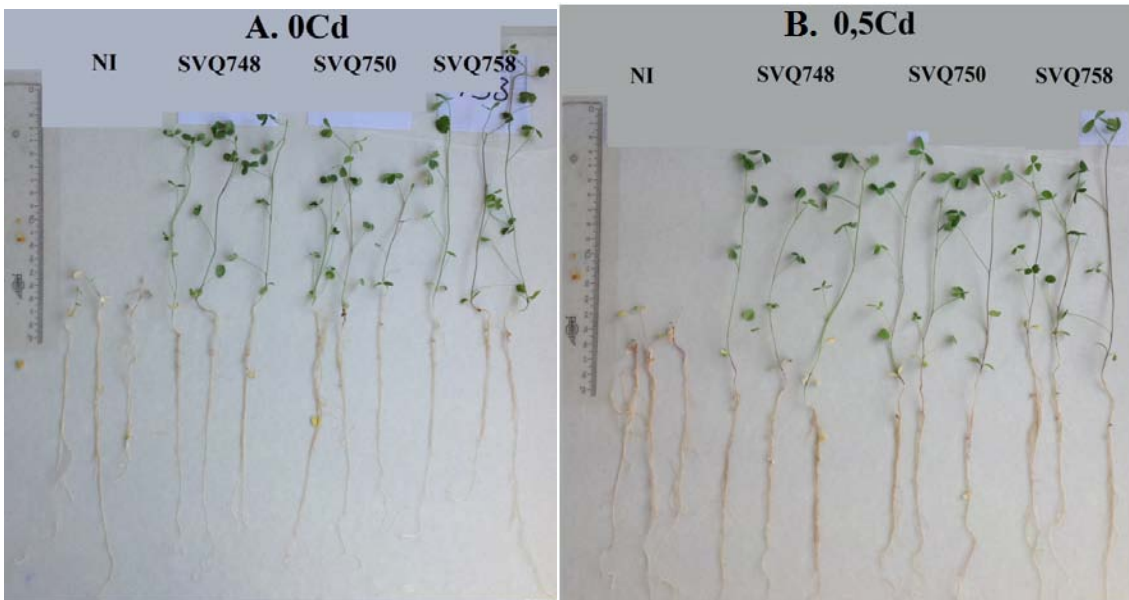
**Figura 7.** Cinética de nodulación de alfalfa inoculada con SVQ748, SVQ750 y SVQ758 en presencia de 0,5 mg/L de CdCl<sub>2</sub>. **A.** Cinética de la Nodulación. **B.** Peso seco de la parte aérea de la planta a los 32 d.p.i. Los datos representan la media de 7 réplicas cada una con dos plantas. Los valores de los mutantes SVQ750 y SVQ758 se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test ANOVA de un factor. Las letras representan diferencias significativas a una  $p < 0,05$ .



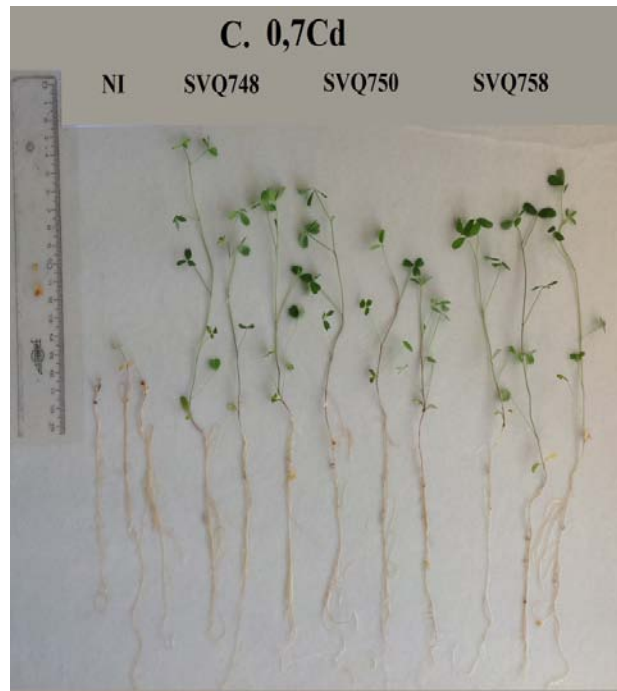
**Figura 8.** Cinética de nodulación de alfalfa inoculada con SVQ748, SVQ750 y SVQ758 en presencia de 0,7 mg/L de CdCl<sub>2</sub>. **A.** Cinética de la Nodulación. **B.** Peso seco de la parte aérea de la planta a los 32 d.p.i. Los datos representan la media de 7 réplicas cada una con dos plantas. Los valores de los mutantes SVQ750 y SVQ758 se compararon individualmente con los de la estirpe parental usando el test ANOVA de un factor. Las letras representan diferencias significativas a una  $p < 0,05$ .



**Figura 9.** Cinética de nodulación de alfalfa **A.** Silvestre SVQ748, **B.** Mutante SVQ750 y **C.** Mutante SVQ758 a diferentes concentraciones de cadmio: sin cadmio, 0,5 y 0,7 mg/L CdCl<sub>2</sub>.



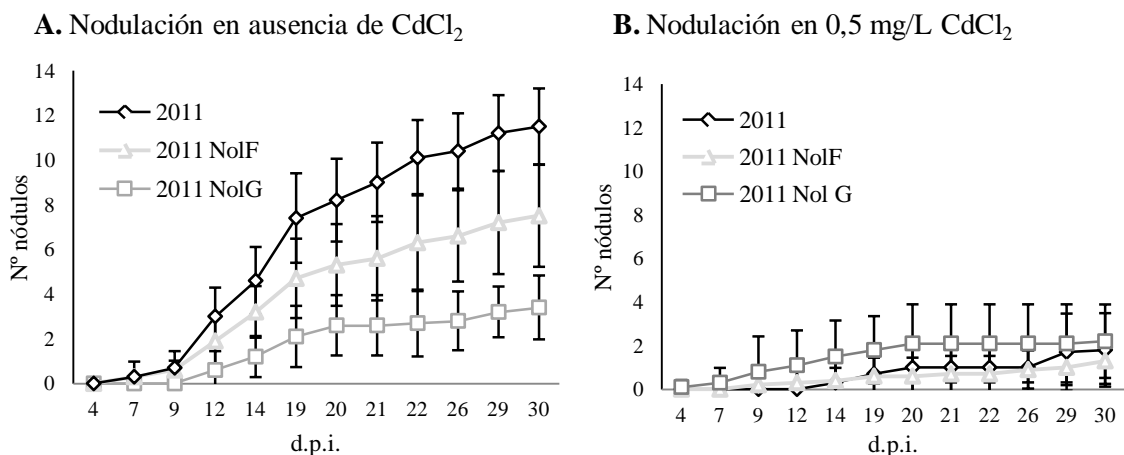


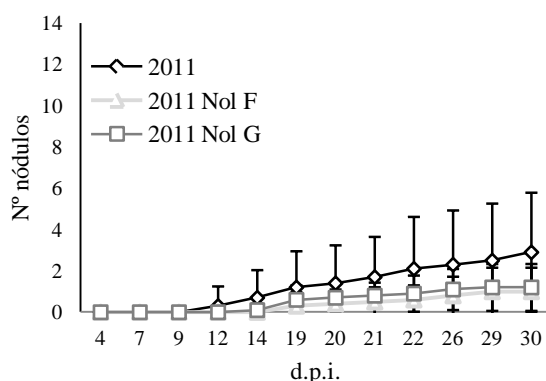


**Figura 10.** Aspecto de las plantas de alfalfa, **A.** en ausencia de  $\text{CdCl}_2$ , **B.** a 0,5 mg/L de  $\text{CdCl}_2$  y **C.** a 0,7 mg/L de  $\text{CdCl}_2$  tras la inoculación con el silvestre SVQ748 y los mutantes SVQ750 y SVQ758.

Los ensayos con Rm2011 y sus derivados se realizaron en tubos de 18 mm de diámetro. En ausencia de cadmio, las plantas inoculadas con 2011NoIF fueron más rápidas formando nódulos (7 d.p.i.) que las inoculadas con 2011 y 2011NoIG (12 d.p.i.) (Figura 11A). Además, se detectó menor número de nódulos en las plantas inoculadas con 2011NoIF y aún menor con 2011NoIG al final del ensayo.

A 0,5 mg/L de  $\text{CdCl}_2$ , se observó un significativamente mayor número de nódulos en 2011NoIG frente a 2011 a los 14 d.p.i. y entre 2011NoIG y 2011NoIF a los 19 d.p.i. (Figura 10B). A 0,7 mg/L de  $\text{CdCl}_2$ , mostraron un mayor número de nódulos las plantas inoculadas con 2011 que con 2011NoIF y 2011NoIG al final del ensayo. Además, las inoculadas con 2011 formaron nódulos a los 12 d.p.i., y las inoculadas con 2011NoIF y 2011NoIG no desarrollaron nódulos hasta los 19 y 20 d.p.i. (Figura 10C).



C. Nodulación en 0,7 mg/L CdCl<sub>2</sub>

Diferencias Significativas			
B. Cinética de Nodulación (0,5 mg/L CdCl <sub>2</sub> )			
	2011	2011NolG	2011Nol F
14 d.p.i.	0,3 B	1,5 A	0,4 AB
19 d.p.i.	0,7 A	1,8 AB	0,6 B

**Figura 10.** Cinética de nodulación de alfalfa *M. sativa* inoculada con las estirpes 2011, 2011NolF y 2011NolG. Concentración de cadmio final: A. Sin cadmio, B. 0,5 mg/L CdCl<sub>2</sub>, 0,7 mg/L CdCl<sub>2</sub>. Los datos representan la media de 10 réplicas con 2 plantas en cada tubo. Los valores de los mutantes 2011NolF y 2011NolG se compararon individualmente con los de la estirpe parental 2011 usando el test ANOVA de un factor. Las letras representan diferencias significativas a una  $p < 0,05$ .

### Competitividad por la nodulación de *E. meliloti* 2011 y sus derivados en alfalfa

Los ensayos de competitividad realizados mostraron claramente una mayor capacidad competitiva de 2011NolF frente al silvestre 2011, observándose que más del 60% de los nódulos estaban ocupados por 2011NolF. El mutante 2011NolG fue prácticamente similar a 2011 (47,4%).

### Discusión

Se seleccionó el gen *nolG* para estudiar su posible papel en la resistencia a distintos tóxicos y en la simbiosis con la alfalfa en *E. meliloti* Rm2011 y *E. medicae* SVQ748 y, además, el gen *nolF* en *E. meliloti* Rm2011.

Los estudios con antimicrobianos pusieron de manifiesto una alta resistencia intrínseca a sustancias como metanol, desoxicolato sódico, luteolina, naringenina, piperacilina y rifampicina en *E. medicae* SVQ748 y derivados y a metanol, desoxicolato sódico, luteolina, naringenina y tetraciclina en *E. meliloti* Rm2011 y derivados. No se encontraron diferencias significativas de tolerancia de los distintos mutantes en *nolG* y en *nolF* con respecto a los parentales (Figuras 1A, 1B, 2A y 2B), por lo que estos genes no parecen tener un papel importante en estas tolerancias, lo que concuerda con los datos obtenidos por otros autores [29,35,36]. Tampoco hubo diferencias en la tolerancia a los metales pesados ensayados entre 2011 y SVQ748 y sus respectivos mutantes (Figuras 1C y 2C). Por tanto, es posible que ninguno de estos genes tenga actividad destoxicadora de metales ni de otras sustancias en estas bacterias o bien porque no se expresaran en las condiciones ensayadas, dado que se encuentran bajo un promotor del tipo caja de nodulación; quizás estos ensayos habría que repetirlos en presencia de luteolina como flavonoide inductor. Por otra parte, el mutante por delección SVQ758 fue más resistente que SVQ750 y SVQ748 y 2011 fue ligeramente más resistente que SVQ748 a los metales.

Las mutaciones por inserción en *nolF* y en *nolG* de *E. meliloti* 2011 no causaron ningún efecto sobre la morfología de las colonias ni sobre la producción de EPS ni sin ni con luteolina. Sin embargo, los mutantes en *nolG* de *E. medicae* SVQ748 mostraron diferencias morfológicas mucho más drásticas en el mutante por inserción (Figura 4A). Además, este último presentó fluorescencia en ausencia de luteolina (Figura 4B y 4C), lo que indicaría que la mutación por inserción estaría afectando a otros factores que habría que determinar.

En ausencia de luteolina, la mutación 2011NolF redujo significativamente la movilidad *swimming*. Sin embargo, con luteolina 2011NolG la aumentó (Figura 5). Esto indicaría un distinto papel de los genes en estado libre o bajo simbiosis. Lo que fue claro es la disminución en la movilidad de todas las cepas por la presencia de luteolina, datos que concuerdan con los obtenidos por Alías-Villegas (2016)[29]. Esta misma autora describió que *E. medicae* SVQ750 fue menos móvil con o sin luteolina que SVQ748. El distinto comportamiento que la mutación por inserción provoca sobre la movilidad tipo *swimming* indicaría un distinto papel del sistema RND, o de las sustancias que exporta, en la movilidad de estas bacterias. Por otro lado, el efecto reductor de la movilidad que provoca la luteolina en *E. meliloti* 2011 y *E. medicae* SVQ748 podría tener su explicación en la implicación simbiótica de la movilidad, ya que la luteolina actuaría como señal indicativa de la presencia de la planta, lo que activaría los sistemas de colonización, formación de biopelículas sobre la raíz, curvatura del pelo radical, etc.

En cuanto al papel de estos genes en la simbiosis con la alfalfa, *E. meliloti* 2011NolG es igual de competitivo que su parental 2011. Sin embargo, 2011NolF fue más competitivo que el silvestre. Por lo que, de nuevo, se puso de manifiesto un diferente efecto en la mutación de *nolG* y *nolF*. Sin embargo, según lo reportado por Alías Villegas (2016)[29] el mutante SVQ750 no tenía alterada la competitividad frente a SVQ748.

La mutación por inserción en *nolG* produjo un retraso en la formación de nódulos y reducción del número final de nódulos en *E. medicae* SVQ748, lo que no ocurrió en la mutación por delección (Figura 6A), por lo que es posible que haya un efecto polar sobre el gen *nodN* o sobre otra característica de esta bacteria. Curiosamente, el mutante SVQ758 provocó un mayor peso de la planta que el parental SVQ748, aunque las diferencias no fueron significativas. Además, el cadmio a una concentración de 0,7 mg/L afectó a la cinética y al número de nódulos en *E. medicae* SVQ748 pero este efecto no se observó tan claramente en los mutantes en *nolG*. Curiosamente, el cadmio afectó en general más al silvestre que a los mutantes.

Las mutaciones por inserción en *nolF* y *nolG* retrasaron la aparición de nódulos y disminuyeron el número de éstos en *E. meliloti* 2011. La adición de 0,5 y 0,7 mg/L de CdCl<sub>2</sub> provocó una disminución drástica en la velocidad de aparición de los nódulos y en el número de éstos tanto en el parental como en los dos mutantes; por lo que *E. meliloti* 2011 parece proteger a la simbiosis con la alfalfa en menor medida que *E. medicae* SVQ748.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir que los genes *nolG* de *E. medicae* SVQ748 y de *E. meliloti* 2011 así como el gen *nolF* de *E. meliloti* 2011 no parecen estar implicados en la tolerancia a sustancias antimicrobianas, antibióticos ni metales pesados. Sin embargo, tienen importancia en la movilidad de tipo *swimming* y en algunas otras características de estos rizobios. Además, mutaciones en estos genes tienen efectos en propiedades tan importantes simbióticamente como la cinética o la competitividad por la nodulación aunque el papel exacto pueda quedar por determinar. Además el cloruro de cadmio, a concentraciones de 0,7 mg/L afectan a la simbiosis de estas bacterias con la alfalfa.

## Agradecimientos

Estoy muy agradecida al Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, por permitirme desarrollar este trabajo, a la tutora del proyecto, la doctora María del Rosario Espuny, así como a todos los integrantes del departamento por sus consejos y la ayuda recibida en todo momento.

## Bibliografía

1. Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. & Batut, J. 2009 Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends Microbiol.* **17**, 458–466.
2. Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S. & Downie, J. A. 2011 The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annu. Rev. Genet.* **45**, 119–44.
3. D’Haeze, W. & Holsters, M. 2002 Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **12**, 79R–105R.
4. Kondorosi, E., Mergaert, P. & Kereszt, A. 2013 A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **67**, 611–28.
5. Patriarca, E. J., Tatè, R., Ferraioli, S. & Iaccarino, M. 2004 Organogenesis of legume root nodules. *Int. Rev. Cytol.* **234**, 201–62.
6. Wang, D., Yang, S., Tang, F. & Zhu, H. 2012 Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cell. Microbiol.* **14**, 334–342.
7. Minami, E., Kouchi, H., Carlson, R. W., Cohn, J. R., Kolli, V. K., Day, R. B., Ogawa, T. & Stacey, G. 1996 Cooperative action of lipo-chitin nodulation signals on the induction of the early nodulin, ENOD2, in soybean roots. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 574–583.
8. Oldroyd, G. E. D. 2013 Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 252–63. (doi:10.1038/nrmicro2990)
9. Gage, D. J. 2004 Infection and invasion of roots by symbiotic nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **68**, 280–300.
10. Fraysse, N., Couderc, F. & Poinso, V. 2003 Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1365–1380.
11. Sharon, R., Long & David, W. & Ehrhardt 1989 New route to a sticky subject. *Nature* **338**, 545–546.
12. Geurts, R. & Bisseling, T. 2002 Nod Factor Perception and Signalling. *Plant Soil* , 239–249.
13. Daniels, R. et al. 2006 Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 14965–70.
14. Pérez-Montaña, F. et al. 2011 Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of N-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Res. Microbiol.* **162**, 715–723.
15. Pérez-Montaña, F., Jiménez-Guerrero, I., Contreras Sánchez-Matamoros, R., López-Baena, F. J., Ollero, F. J., Rodríguez-Carvajal, M. A., Bellogín, R. A. & Espuny, M. R.

- 2013 Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Res. Microbiol.* **164**, 749–760.
16. Kearns, D. B. 2010 A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol* **8**, 634–644.
  17. Walsh, K. B. 1995 Physiology of the legume nodule and its response to stress. *Soil Biol. Biochem.* **27**, 637–655.
  18. Nies, D. H. 2003 Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 313–339.
  19. Guffanti, A. A., Wei, Y., Rood, S. V & Krulwich, T. A. 2002 An antiport mechanism for a member of the cation diffusion facilitator family: divalent cations efflux in exchange for K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup>. *Mol Microbiol* **45**, 145–153.
  20. Bloss, T., Clemens, S. & Nies, D. H. 2002 Characterization of the ZAT1p zinc transporter from *Arabidopsis thaliana* in microbial model organisms and reconstituted proteoliposomes. *Planta* **214**, 783–791.
  21. Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z. & Kondorosi, A. 1991 Six nodulation genes of nod box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. *Mol Gen Genet* **228**, 113–124.
  22. Baev, N., Schultze, M., Barlier, I., Ha, D. C., Virelizier, H., Kondorosi, E. & Kondorosi, A. 1992 *Rhizobium nodM* and *nodN* genes are common nod genes: *nodM* encodes functions for efficiency of nod signal production and bacteroid maturation. *J Bacteriol* **174**, 7555–7565.
  23. Eda, S., Mitsui, H. & Minamisawa, K. 2011 Involvement of the *smeAB* multidrug efflux pump in resistance to plant antimicrobials and contribution to nodulation competitiveness in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl Env. Microbiol* **77**, 2855–2862.
  24. Saier Jr., M. H., Tam, R., Reizer, A. & Reizer, J. 1994 Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* **11**, 841–847.
  25. Hernandez-Mendoza, A., Quinto, C., Segovia, L. & Perez-Rueda, E. 2007 Ligand-binding prediction in the resistance-nodulation-cell division (RND) proteins. *Comput Biol Chem* **31**, 115–123.
  26. Meade, H. M. & Signer, E. R. 1977 Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 2076–2078.
  27. Pobigaylo, N., Szymczak, S., Nattkemper, T. W. & Becker, A. 2008 Identification of genes relevant to symbiosis and competitiveness in *Sinorhizobium meliloti* using signature-tagged mutants. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 219–231.
  28. Alías-Villegas, C., Cubo, M. T., Lara-Dampier, V., Bellogín, R. A., Camacho, M., Temprano, F. & Espuny, M. R. 2015 *Rhizobial* strains isolated from nodules of *Medicago marina* in southwest Spain are abiotic-stress tolerant and symbiotically diverse. *Syst. Appl. Microbiol.* **38**, 506–514.
  29. Alías-Villegas, C. 2016 Caracterización de rizobios aislados de leguminosas del suroeste de Andalucía e implicación del gen *nolG* en la simbiosis *Ensifer meliloti* ORT12 - *Medicago sativa*.
  30. Beringer, J. E. 2974 R Factor Transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*

- , 188–198.
31. Vincent, J. M. 1970 *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford (Reino Unido): Blackwell Scientific Publication.
  32. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. & Turck, M. 1966 Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Tech Bull Regist Med Technol* **36**, 49–52.
  33. Cha, C., Gao, P., Chen, Y. C., Shaw, P. D. & Farrand, S. K. 1998 Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 1119–1129.
  34. Rigaud, J. & Puppo, A. 1975 Indole-3-acetic Acid Catabolism by Soybean Bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* **88**, 223–228.
  35. Delorme, T. A., Gagliardi, J. V, Angle, J. S., van Berkum, P. & Chaney, R. L. 2003 Phenotypic and genetic diversity of rhizobia isolated from nodules of clover grown in a zinc and cadmium contaminated soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **67**, 1746–1754.
  36. Wei, G. H., Tan, Z. Y., Zhu, M. E., Wang, E. T., Han, S. Z. & Chen, W. X. 2003 Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1575–1583.