

"La simbiosis fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa: Aproximaciones ómicas aplicadas a la identificación y caracterización de determinantes genéticos del rizobio asociados a la colonización temprana de la raíz de alfalfa (*Medicago sativa*)"

Trabajo de Tesis Doctoral

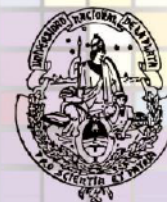
2015

María Eugenia Salas

Dirección: Prof. Dr. Antonio Lagares

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas



El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata – CCT – La Plata –CONICET, bajo la dirección del Profesor Dr. Antonio Lagares.

A mis increíbles Padres,

Mi reconocimiento,

A la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de la Plata, por ser la institución que me dio el lugar de alumna, de graduada y de docente. Por el cariño que le tengo como Institución y cómo lugar de trabajo.

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) y al conjunto de gente que lo forma, por brindarme el espacio físico y personal propicio para la realización de este trabajo de Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICET) por haberme otorgado las Becas que significaron el apoyo económico gracias a las cuales pude dedicarme estos años a la realización de este trabajo.

Al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINCyT) y al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por el apoyo económico para mi estadía corta en el exterior.

Mi más sincero agradecimiento,

A *Tony*, por dirigir esta tesis con un enorme entusiasmo, con un gran sentido de la responsabilidad y del trabajo conjunto. Gracias por su mirada siempre criteriosa, por la palabra precisa, por el aliento constante y su gran confianza. Gracias, por haber hecho de esta tesis un gran aprendizaje que, sobre todo, he disfrutado mucho.

A *Mauri*, que me ha ayudado y enseñado muchísimo siempre, desde el primer día. Gracias por el trabajo conjunto, por remarla juntos en la búsqueda de “un gen”, por los scripts para todo y su gran compañerismo. Para mí ha sido un placer y una gran alegría haber formado parte de este equipo. Gracias además, y entre tantas otras cosas, por ser el creador de la portada de esta tesis.

A *Carlita, El Tenso, José, Ile, Yuli, Flor A.*, a todos y en lo personal a cada uno por ser parte del día de la mejor manera. Por las mil historias para contar, por el apoyo y la ayuda recibida. Gracias por convertir a cada día de trabajo en un capítulo de una serie cómica. El agradecimiento es enorme porque definitivamente no hubiese sido lo mismo sin ustedes.

A *Floppy*, por ser una grande siempre dispuesta a ayudarme en lo que necesité. Por demostrarnos la manera de hacer las cosas mejor y más simples para todos. Por siempre preguntar y estar.

A *Mariano*, por su admirable memoria que nos recuerda cada trámite, vencimiento o hecho del pasado. Por compartir el minuto a minuto de todo lo que pasa a nuestros alrededores y por sus consejos.

A *Angie*, por sus buenas energías y sus buenos deseos siempre. Por su compañerismo y su predisposición para ayudar en todo.

A *Walter*, por su gran sentido del humor que me ha hecho divertirse tanto. Gracias por la ayuda, los consejos, los mates y las charlas.

A *Gonza*, por decirme, tan acertadamente, que RPS era un lindo lugar para trabajar. Gracias por la ayuda y los consejos de mesada.

A la *Dra. Anke Becker* por aceptar el trabajo en colaboración y cedernos la biblioteca de mutantes con la que fue posible llevar a cabo este proyecto. A ella y a todo su equipo de SYNMIKRO, en especial a *Marta* y *Benny* por hacer de mis días en Marburg una etapa inolvidable. A *Barbara*, por su hospitalidad y su ayuda con los arreglos.

Al *Dr. Gustavo Parisi*, por involucrarse con el proyecto. Por su ENORME ayuda y predisposición a la hora de descifrar las letras.

A *Anto Lagares (Jr)* y *Claudio Valverde*, por el tráfico de cepas y muestras, por la buena onda siempre. Gracias por ese inolvidable curso EMBO en Quilmes, del que fue un enorme placer participar.

A los *hermanitos R3* todos, por hacer la convivencia divertida, por los mangazos, las horas, los almuerzos, festejos y charlas compartidas. Gracias por la buena onda y los buenos deseos siempre.

A mis amigos *Bordetelos*, por adoptarme como una de ustedes desde el primer día y hacerme participe como una más en sus almuerzos, juntadas y festejos. Gracias por recibirme siempre allá arriba con mucho cariño.

A mis compañeros (becarios y algunos ya investigadores) del instituto por ser parte del camino recorrido, por el día a día, por el saludo a la distancia. Por siempre ayudar y hacerla fácil. A todos y en especial a los que tuve la suerte de conocer más, por compartir las alegrías y los malos ratos, por el aliento y la amistad.

A *Pity*, que siempre me ha demostrado su apoyo, por ser una gran persona a la que le tengo un gran afecto.

A *Celina*, por alentarme a salir un poco del labo, por su energía y su apoyo.

A todo el personal profesional, administrativo y personal de apoyo del Instituto. Porque tienen un trabajo difícil de responder a todos, y siempre he tenido un sí como respuesta. Gracias por la gran ayuda y el aliento constante.

A *Rubencito*, quien me ha hecho parte de su familia, gracias por recibirme con la misma alegría desde el primer día.

Finalmente,

A mis amigas de Saladillo, por extrañarme y recibirme siempre con el mismo cariño.

A mis amigos de la facu, el querido *GS*, que son una inyección de energía y una fuente de alegría constante.

A "*La Nietada*", mis primos residentes en La Plata, por las alegrías y las noches de juntadas.

A los *Rodenak-Kladniew*, por el adoptarme con mucho cariño como una más de la familia.

A mis viejos *Mirta* y *Santiago* y a mis hermanas *Lucre* y *Ana*, por tanto amor incondicional. Gracias por esperarme siempre con el abrazo y la comida como si viniera de la mismísima guerra. Gracias por el apoyo y las incontables maneras de ESTAR conmigo siempre. A mis tres hermosas sobrinas *Delfi*, *Cande* y *Emma* por darnos a toda la familia la felicidad plena.

A *Boris*, por ser el mejor compañero de ruta que podría pedir. Gracias por bancarme en todas, por su apoyo incondicional, su paciencia y su amor.

Abreviaturas

%CV	Coficiente de variación	Tc	Tetraciclina
°C	Grados Celsius	Tn5	Transposón Tn5
ADN	Ácido Desoxirribonucleico	u.f.c.	Unidades Formadoras de Colonias.
ARN	Ácido Ribonucleico	µg	Microgramo
dNTPs	Desoxirribonucleótidos	µl	Microlitro
DO	Densidad Óptica	µM	Micromolar
d.p.i.	Días Post Inoculación		
FA	Firmemente asociadas		
FBN	Fijación Biológica de Nitrógeno		
Fig.	Figura		
g	Gramo		
Gb	Gigabase= 1×10^9 pb		
hs	Horas		
Kb	Kilobase= 1×10^3 pb		
Km	Kanamicina		
l	Litro		
LA	Laxamenta asociadas		
m	Metro		
M	Molar		
Mb	Megabase= 1×10^6 pb		
mg	Miligramo		
min	Minuto		
ml	Mililitro		
mm	Milímetro		
mM	Milimolar		
Nal	Acido Nalidixico		
NF	Factor Nod		
Nm	Neomicina		
pb	Pares de Bases		
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa		
pH	Potencial Hidrógeno		
RIVET	Recombination based in vivo expression technology		
rpm	Revoluciones por minuto		
SDS	Dodecil sulfato de sodio		
Sm	Estreptomina		
STM	Signature tagged Mutagenesis		
Tb	Terabase= 1×10^{12} pb		
Tm	Temperatura del <i>melting</i> o fusión		

Índice

Abreviaturas	7
Índice.....	9
Resumen.....	17
Capítulo I. Introducción.....	19
I.1. La fijación biológica de nitrógeno y su importancia en el contexto de una agricultura sustentable.....	21
I.2. La simbiosis fijadora de nitrógeno rizobio-leguminosa.....	23
I.2.1. Generalidades de los rizobios y las plantas leguminosas	23
I.2.2. Los rizobios y su vida libre.....	24
I.2.3. Eventos iniciales de la interacción rizobio-leguminosa.	25
<i>Definición, estructura y dinámica de la rizósfera.....</i>	<i>25</i>
<i>Perfil transcripcional de los rizobios en la rizósfera</i>	<i>27</i>
<i>Llegada a la rizósfera: Quimiotaxis y movilidad</i>	<i>28</i>
I.2.4. Moléculas señal y componentes involucrados en las primeras etapas de la interacción rizobio-leguminosa.....	28
<i>Flavonoides y factores de nodulación (NF).....</i>	<i>29</i>
<i>Otros determinantes de especificidad:.....</i>	<i>31</i>
<i>Proteínas secretadas por los rizobios a través de sistemas de secreción de tipo I, III, IV y VI.....</i>	<i>31</i>
<i>Polisacáridos</i>	<i>32</i>
<i>Adhesión y colonización</i>	<i>33</i>
I.2.5. Percepción de los factores Nod y respuestas de la planta	33
I.2.6 Desarrollo y progresión del hilo de infección	36
I.2.7. Diferenciación y supervivencia	36
<i>Factores de la planta que dirigen la diferenciación</i>	<i>39</i>
<i>Regulación de nodulación</i>	<i>40</i>
I.3. Abordajes metodológicos para el estudio de interacciones simbióticas y nichos de difícil acceso.....	42
I.3.1. Técnicas para análisis transcripcional <i>in vivo</i> : Sistemas trampa de promotores (IVET y RIVET).....	43
<i>Variantes construidas en nuestro laboratorio</i>	<i>45</i>
<i>Antecedentes del uso de herramientas trampa para el estudio de rizósferas y de la simbiosis S. meliloti- alfalfa.....</i>	<i>47</i>
<i>Ventajas y desventajas de los sistemas de trampa de promotores</i>	<i>47</i>
I.3.2. Aproximaciones funcionales para el estudio de interacciones microorganismo-huésped.....	48

Objetivos	53
Capítulo II. Materiales y Métodos	55
II. 1. Procedimientos Microbiológicos	57
II.1.1. Cultivos bacterianos	57
Condiciones de crecimiento	57
Curvas de crecimiento	57
Antibióticos	58
II.1.2. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	59
II.1.3. Transferencia de ADN	59
Transformación - Electroporación	60
Conjugación	60
Transducción	60
II.2. Técnicas de Biología Molecular	61
II.2.1 Construcciones genéticas y manipulación de ADN	61
Preparaciones de ADN plasmídico	61
Preparación de ADN total de <i>S. meliloti</i>	62
Determinación de concentraciones de ADN	62
Electroforesis en geles de agarosa	62
Tratamientos enzimáticos del ADN	63
II.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR cuantitativa (qPCR)	63
II.3. Ensayos de plantas	63
II.3.1. Esterilización y germinación de semillas	63
II.3.2. Condiciones de cultivo	64
II.3.3. Preparación de exudados radiculares	64
II.3.4. Re-aislamiento de los rizobios de nódulos radiculares	64
II.4. Ensayos STM	64
II.4.1. Traslado y conservación de mutantes STM	64
II.4.2. Desafío de mezclas de mutantes en condiciones de colonización de rizósfera de plantas de alfalfa y arveja	65
II.4.3 Almacenamiento de muestras STM	66
II.4.4. Extracción de ADN a partir de las muestras extraídas de raíz	66
II.4.5. Amplificación de firmas	67
II.4.6. Generación de la mezcla de productos de amplificación para secuenciamiento	67

II.4.7. Secuenciamiento y procesamiento de datos	68
II.4.8. Microarreglos	70
Amplificación y purificación de productos de PCR	70
Hibridación	70
Análisis de datos.....	71
II.4.9. Experimentos de co-inoculación en rizósferas de plantas de alfalfa y arveja.	71
II.5. Observación de fluorescencia verde debida a la expresión de GFP.....	72
II.6. Bases de datos utilizadas	72
Capítulo III. Nuevas herramienta para estudios transcriptómicos diferenciales por tecnología RIVET: Construcción y validación de un transposón mini-Tn5 para la generación de fusiones transcripcionales al gen de la resolvasa (TnpR)	73
III.1. Introducción	75
III.1.1. El estudio de la simbiosis en nichos de difícil acceso con métodos ómicos. Metodologías generales: Estudios de expresión, y búsqueda de genes con impacto fenotípico.	75
III.1.2. La vida asociativa. Intercambio de señales, genes simbióticos.	76
III.1.3. Abordaje al transcriptoma desde técnicas de expresión in vivo (RIVET, Recombination – “In Vivo” Expression Technology) para la detección de marcadores simbióticos.	77
III.2. Diseño y construcción de vectores trampa de promotores basados en el uso de un mini-transposon Tn5.	78
III.3. Construcción de una variante transposicional portadora de un origen de replicación funcional en <i>E. coli</i>.	79
III.4. Validación funcional de las herramientas construidas.....	81
III.5. Consideraciones finales.	82
III.5.1. Evaluación de las posibilidades del uso en <i>S. meliloti</i> de la herramienta desarrollada.....	82
III.5.2. Alternativas experimentales para el estudio de etapas simbióticas tempranas.	83
Capítulo IV. Selección fenotípica de mutantes de <i>S. meliloti</i> alterados en la colonización temprana de raíces de alfalfa, empleando mutantes transposicionales etiquetados con firmas (STM). Parte I. Diseño general del ensayo.	85
IV.1. Introducción.....	87
IV.1.1. Espacio limitado del nicho simbiótico. Competitividad para la nodulación. Colonización rizosférica.	87
IV.1.2. Abordaje a la identificación, a escala ómica, de marcadores genéticos asociados a fenotipos específicos: Uso de mutantes etiquetados con firmas (STM). Antecedentes.	88
IV.1.3. STM para el estudio de la bacteria simbiótica modelo <i>S. meliloti</i> . Aplicaciones a otros sistemas. Otras aproximaciones experimentales similares.	89
IV.2. Características de la biblioteca mini-Tn5-STM que se utilizará en este trabajo de tesis.	90

IV.3. Diseño del ensayo para estudiar colonización radicular con herramientas de STM.	90
IV.3.1. Condiciones experimentales. Consideraciones numéricas.....	90
IV.3.2. Inoculación de plantas: Título bacteriano de la mezcla inicial, periodo de incubación y poblaciones de bacterias adheridas laxas y firmes.....	91
IV.3.3. Extracción de ADN del inoculante inicial y de los rizobios recuperados de raíz.....	94
IV.3.4. Reacción de PCR para la amplificación de las firmas H y K. Cebadores utilizados.	95
IV.3.4.1. Especificidad de la amplificación	96
IV.3.4.2. Evaluación de la sensibilidad y de la eficiencia de la amplificación.....	97
IV.4. Esquema general. Consideraciones finales.....	99
Capítulo V. Aproximación experimental STM clásica mediante el uso de microarreglos de ADN, aplicada a la búsqueda de mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados en colonización radicular.....	103
V.1. Introducción.....	105
V.2. STM aplicada al estudio de 412 mutantes en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i.....	105
V.2.1. Desafío. Preparación de muestras de entrada y salida.	105
V.2.2. Evaluación del cambio en la proporción de firmas de la mezcla final con respecto a la mezcla inicial.	106
V.2.3. Análisis de datos provenientes de las hibridaciones.	107
V.3. Inspección de los genes afectados. Ensayos de validación.	109
Capítulo VI. Evaluación simultánea de millares de mutantes en su capacidad de colonizar raíces, utilizando STM acoplada a secuenciación masiva de alta penetración. Validación y contrastación con el uso de microarreglos.	115
VI.1 Introducción.....	117
VI.2 Utilización de plataformas de secuenciamiento de alta penetración para el conteo de firmas en ensayos STM. Consideraciones generales.....	117
VI.3 Diseño de oligonucleótidos	118
VI.4. Seguimiento del esquema experimental	119
VI.4.1. Amplificación	119
VI.4.2. Generación de la mezcla para secuenciamiento	121
VI.4.3. Secuenciamiento. Cálculo del número de lecturas requeridas. Elección de la plataforma.....	121
VI.4.4. Análisis informático y estadístico de secuencias.	122
VI.5. Análisis de resultados de la Mezcla N°1 desafiada en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i. Contrastación de los resultados con los obtenidos mediante el uso de microarreglos.	123

VI.6. Búsqueda a escala genómica de marcadores genéticos requeridos para la colonización de raíces de alfalfa por <i>S. meliloti</i> analizados a los 3 d.p.i.: Evaluación de las 15 mezclas de mutantes (más de 6.000 inserciones).	126
VI.6.1. Caracterización de los marcadores identificados, familias de ortólogos, predicciones funcionales.	127
VI.7. Marcadores genéticos requeridos para la colonización de raíces de alfalfa por <i>S. meliloti</i> evaluada a los 7.d.p.i.. Análisis comparativo con los marcadores identificados a los 3 d.p.i. (sección anterior).	129
Capítulo VII. Validación y caracterización de las deficiencias de colonización de clones mutantes seleccionados por STM-secuenciamiento. Búsqueda e identificación de genes de <i>S. meliloti</i> asociados preferencialmente a la colonización de raíces de su planta hospedadora alfalfa.....	133
VII.1. Validación de los resultados obtenidos por STM-secuenciamiento y evaluación del comportamiento diferencial de los mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados en la colonización.....	135
VII.2. Evaluación de la correlación entre los valores de “M” del experimento de STM-secuenciación (M^{STM}), y los obtenidos en los ensayos de recuento por plaqueo ($M^{plaqueo}$).	135
VII.3. Estudios de crecimiento en diferentes medios de mutantes afectados en la colonización.	138
VII.4. Efectos simbióticos tardíos de las deficiencias en la colonización rizosférica temprana de alfalfa por <i>S. meliloti</i> : Evaluación de la competición por la nodulación.	139
VII.5. Búsqueda de marcadores genéticos de <i>S. meliloti</i> asociados preferencialmente a la colonización de raíces de su planta hospedadora alfalfa.	141
VII.6. Marcadores genéticos de <i>S. meliloti</i> asociados a la colonización firme. Comparación de muestras LA y FA.	145
Capítulo VIII. Conclusiones finales, perspectivas.....	149
Anexos	159
Anexo I.....	161
Anexo II.....	173
Referencias	187

Índice de Figuras

Figura I. 1. Esquema de una sección de rizósfera. Localización de rizodepósitos.	26
Figura I. 2. Comienzo del proceso de señalización entre los rizobios y las plantas leguminosas.	30
Figura I. 3. Modelo de señalización inducido en las células epidérmicas de <i>Medicago truncatula</i> por la percepción de factores Nod compatibles.	35
Figura I. 4. Infección y colonización intracelular.	37
Figura I. 5. Desarrollo de nódulos determinados e indeterminados.....	40
Figura I. 6. Esquema de funcionamiento del sistema de expresión in vivo, RIVET.	44
Figura I. 7 Sistema de selección positiva basado en ganancia / pérdida de cassettes de resistencia a antibióticos construido por Lozano et al. (2010)	46
Figura I. 8. Mutagénesis etiquetada por firmas (STM). Esquema y concepto.	49
Figura I. 9. Secuenciación directa de los sitios de inserción (TraDIS).....	50
Figura II. 2. Esquema del procesamiento de plantas en los ensayos STM realizados en esta tesis.	66
Figura III. 1. Estrategia utilizada para la construcción de los vectores que contienen los transposones miniTn5-tnpR-lacZ (A) y miniTn5-tnpR-lacZ-oriV (B).....	80
Figura IV. 1. Número de bacterias asociadas a raíces de alfalfa a distintos tiempos postinoculación, luego de su inoculación con diferentes dosis de bacterias.	93
Figura IV. 2. Número de bacterias de la población LA y FA extraídas de raíces de plantas de alfalfa a los 7 d.p.i.	94
Figura IV. 3. Esquema de los miniTn5-STM construido por Pobilgaylo et al. (2006).	96
Figura IV. 4. Caracterización de los productos de amplificación obtenidos utilizando como molde diluciones seriadas de una extracción de ADN de un cultivo de rizobios generado con una de las mezclas de cuatrocientos mutantes miniTn5-STM.	97
Figura IV. 5. Caracterización por digestión y secuenciación de los productos de amplificación de las firmas H y K.....	98
Figura IV. 6. Gráficos de Ct vs. log No en reacciones de qPCR empleando como cebadores P1-P2 (firma K) y P3-P4 (firma H).....	99
Figura IV. 7. Esquema general del diseño de los ensayos asistidos por STM para el estudio de la colonización temprana de raíces homólogas y heterólogas por el rizobio modelo <i>S. meliloti</i>	101
Figura V. 1. Esquema experimental del ensayo realizado para el estudio de la mezcla N° 1 de mutantes en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i.....	106
Figura V. 2. Gráfica M vs. A obtenida a partir de los arreglos realizados para el análisis de mutantes alterados en la colonización de plantas de alfalfa 3dpi.	108
Figura V. 3. Crecimiento <i>in vitro</i> en medios rico y mínimo de mutantes afectados negativamente en la colonización de raíces.	111
Figura V. 4. Experimentos de colonización de raíces de <i>M. sativa</i> (alfalfa) co-inoculadas con mutantes seleccionados como afectados en colonización por STM, y con la cepa salvaje <i>S. meliloti</i> 2011-GFP.....	112

Figura VI.1. Etiquetado de productos de amplificación, con detalle de las secuencias empleadas en los cebadores (extremos 5' y 3') para codificar el número de mezcla analizada, la condición experimental y su réplica.....	119
Figura VI.2. Curvas de amplificación de firmas de la mezcla de mutantes N°4 con cebadores P3 y P4.....	120
Figura VI.3. Análisis de datos de secuencias para la mezcla N°1 de mutantes desafiada en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i.	124
Figura VI. 4. Clasificación funcional de genes seleccionados por STM por su efecto negativo (parte A) o positivo (parte B) sobre la colonización de raíces de alfalfa analizadas a los 3 d.p.i..	128
Figura VI. 5. Distribución de mutaciones según el replicón en el que se encuentran.	129
Figura VII. 1. Desafíos de validación. Competición por la colonización de la rizósfera de plantas de alfalfa 3 d.p.i.....	136
Figura VII. 2. Gráfica de correlación entre los valores de M obtenidos en el ensayo STM-secuenciamiento (M^{STM}), y los obtenidos en los desafíos de cada mutante frente a la cepa salvaje en los que la colonización se evaluó por plaqueo ($M^{plaqueo}$).....	137
Figura VII. 3. Comportamiento diferencial de los mutantes afectados en colonización.	140
Figura VII. 4. Colonización de raíces de alfalfa y arveja por parte de mutantes seleccionados por STM-secuenciación para evaluar efectos específicos durante la colonización del hospedador homólogo.....	145
Figura C 1 Modelo del proceso de colonización de raíces de leguminosas por rizobios. Señales simbióticas tempranas previamente descritas, y posible localización de los efectos asociados a genes identificados en este trabajo de tesis.	156

Índice de tablas

Tabla II. 1. Composición del medio de cultivo Evans. (Evans, <i>et al.</i> , 1970).....	58
Tabla II. 2. Antibióticos. Soluciones stock y concentraciones utilizadas en cultivos de <i>E. coli</i> y <i>S. meliloti</i>	58
Tabla II. 3	59
Tabla II. 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizado en este trabajo.	63
Tabla II. 5. Composición del medio mineral Fåhraeus para el cultivo de plantas. (Fåhraeus, 1957).....	64
Tabla II. 6. Oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones de las firmas presentes en las muestras STM.....	68
Tabla II. 7. Composición de las soluciones utilizadas para el bloqueo y posterior lavado de los arreglos.....	71
Tabla III. 1. Frecuencia de transposición y de los miniTn5-RIVET que hemos construido, y de integración de sus plásmidos portadores, en diferentes cepas receptoras.	82
Tabla V. 1. Lista de mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados negativamente en la colonización de raíces de alfalfa a los 3 d.p.i. de acuerdo al análisis de firmas realizado en microarreglos.	108
Tabla V. 2. Lista de mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados positivamente en la colonización de raíces de alfalfa a los 3 d.p.i. de acuerdo al análisis de firmas realizado en microarreglos.	109
Tabla VI.1. Comparación de resultados obtenidos para firmas con $M < -0,7$ para la mezcla N°1 de mutantes, desafiada en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i., empleando cuantificación de firmas por: (A) Secuenciación y contaje bioinformático, ó (B) Hibridación de firmas en microarreglos.	125
Tabla VI. 2. Comparación de resultados obtenidos para firmas con $M > 0,7$ para la mezcla N°1 de mutantes, desafiada en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i., empleando cuantificación de firmas por: (A) Secuenciación y contaje bioinformático, ó (B) Hibridación de firmas en microarreglos.	125
Tabla VII. 1. Competición por la ocupación de nódulos en alfalfa de mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados en la colonización radicular frente a la cepa salvaje.....	141
Tabla VII. 2. Mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados preferencialmente en la colonización de raíces de alfalfa.....	143
Tabla VII. 3. Mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados preferencialmente en la colonización de raíces de arveja.....	144
AI. Tabla 1. Lista de mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados negativamente en la colonización de rizósferas de plantas de alfalfa a los 3 d.p.i.	161
AI. Tabla 2. Lista de mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados positivamente en la colonización de rizósferas de plantas de alfalfa a los 3 d.p.i.	167
All. Tabla 1. Lista de mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados negativamente en la colonización de rizósferas de plantas de alfalfa 7 d.p.i.....	173
All. Tabla 2. Lista de mutantes de <i>S. meliloti</i> afectados positivamente en la colonización de rizósferas de plantas de alfalfa 7 d.p.i.	181

Resumen

Sinorhizobium meliloti es una α -proteobacteria capaz de establecer asociaciones simbióticas con plantas de los géneros *Medicago*, *Melilotus* y *Trigonella*. Esta asociación es el resultado de un complejo diálogo molecular entre los simbioses, que se diferencian a lo largo de la interacción para dar lugar a un nuevo órgano en las raíces de las plantas, el nódulo fijador de nitrógeno. El nicho simbiótico accesible a los rizobios está naturalmente limitado, y resulta ocupado por aquellas cepas que muestran ser más competitivas para acceder al mismo. Las evidencias actuales indican que la competitividad para la nodulación es un fenómeno complejo, en el que son particularmente relevantes los procesos que tienen lugar en la vida rizosférica temprana. Lamentablemente, y a pesar del detallado conocimiento actual del proceso de infección y desarrollo de nódulos por los rizobios, muy poco se conoce sobre las etapas críticas de la colonización rizosférica.

La caracterización molecular de las etapas tempranas de la simbiosis, donde el número de rizobios intervinientes es muy escaso, hace difícil el uso de aproximaciones transcriptómicas y proteómicas clásicas. En este marco nace el objetivo general de esta tesis, que utiliza dos alternativas experimentales aplicadas a la búsqueda y selección de determinantes genéticos de los rizobios asociados a la colonización temprana de la rizósfera y del rizoplano de alfalfa por *Sinorhizobium meliloti*.

Por un lado hemos abordado la búsqueda de información sobre el conjunto de transcritos específicamente inducidos en las etapas tempranas de la simbiosis, y para esto nos hemos enfocado en el mejoramiento de las herramientas disponibles para hacer estudios RIVET (*Recombination based In Vivo Expression Technology*). Dicha técnica utiliza una biblioteca de fusiones transcripcionales de todos los genes del microorganismo con el gen una recombinasa específica (*tnpR* sin promotor), cuya expresión será indicio de la actividad promotora del gen al que estaba fusionado la recombinasa y da como resultado la escisión (pérdida) de un *cassette* de ADN indicador presente en la misma bacteria en un lugar neutro de su genoma. Atento a la dificultad que significa la construcción de bibliotecas genómicas en vectores plasmídicos, en esta tesis hemos construido y validado una variante de módulo sensor que utiliza un transposón como herramienta para generar las fusiones transcripcionales, útil para estudios RIVET en diferentes gram-negativos y que representa una alternativa valiosa en reemplazo de la construcción de bibliotecas plasmídicas.

En la segunda parte del trabajo de tesis hemos abordado la búsqueda y selección fenotípica de determinantes genéticos involucrados en las primeras etapas de la interacción simbiótica utilizando técnicas de mutagénesis etiquetada por firmas STM (*Signature Tagged Mutagenesis*). Esta metodología utiliza un conjunto de mutantes portadores de transposones mini-Tn5 etiquetados con una secuencia de nucleótidos que le es propia (*firma*) y que permite por tanto conocer la cantidad relativa de cada mutante en presencia de los otros. El desafío de un conjunto de mutantes a una condición de interés y la posterior evaluación de la proporción de cada firma al inicio y al final del experimento permite conocer que mutaciones redundan en efectos negativos y positivos sobre la condición estudiada. Hemos utilizado por primera vez la técnica de mutantes etiquetados asistida por plataformas de secuenciamiento de alta penetración para la evaluación del comportamiento de más de 6000 mutantes de *S. meliloti* en su capacidad de colonizar raíces de alfalfa y una leguminosa heteróloga (arveja). Los resultados alcanzados nos permitieron identificar más de un centenar de genes afectados en la colonización de raíces de alfalfa, algunos de los cuales resultaron específicos de la planta huésped. La identificación de las funciones asociadas a varios de esos genes nos ha permitido conocer actividades vinculadas a este proceso y proponer un modelo que explique las actividades requeridas para la colonización temprana del huésped.

Capítulo

Introducción

I.1. La fijación biológica de nitrógeno y su importancia en el contexto de una agricultura sustentable

El nitrógeno es uno de los cinco elementos más abundantes en nuestro sistema solar, y junto con el Oxígeno, Hidrógeno y Carbono forma el núcleo de elementos fundamentales en la vida de toda célula. Entre muchas otras biomoléculas importantes, el nitrógeno es un constituyente fundamental de los aminoácidos, nucleótidos, vitaminas y pigmentos.

A pesar de la abrumadora abundancia de este elemento en la atmósfera y rocas sedimentarias, el nitrógeno es un elemento que limita el crecimiento de plantas ya que éstas sólo son capaces de incorporarlo en sus formas reducidas (también llamadas combinadas). Todo el requerimiento nutricional de nitrógeno de animales y humanos es incorporado, directa o indirectamente de las plantas. Se estima que la población mundial prácticamente duplicó su número durante los últimos 50 años del siglo XX, este aumento se ha encontrado fuertemente asociado a la implementación de nuevas prácticas agrícolas dentro de las cuales, una de las más destacables es el comienzo de la utilización masiva de fertilizantes nitrogenados producidos industrialmente por el proceso Haber-Bosch (Olivares, *et al.*, 2013).

Estos fertilizantes sin duda han contribuido enormemente a una producción alimentaria suficiente para mantener el crecimiento de la población, sin embargo, los costos ecológicos asociados a la producción y utilización masiva de estos productos son evidentes en el suelo, tanto como en el agua y el aire. La producción industrial de amonio (NH_3) a partir de nitrógeno molecular (N_2) se encuentra asociada al empleo de grandes cantidades de energías no-renovables (gas y petróleo). Por otro lado, la eficiencia de incorporación de nitrógeno en los cultivos es baja (alrededor del 35%), por lo que el nitrógeno remanente en los suelos es utilizado por bacterias nitrificantes y desnitrificantes que contribuyen a las emisiones de NO_x y N_2O . La liberación de estos gases nitrogenados a la atmósfera, contribuye al efecto invernadero, la destrucción de la capa de ozono y la lluvia ácida, por tanto a la contaminación del aire y al calentamiento global que constituyen un riesgo para el medio ambiente. Además, las prácticas de labranza intensivas contribuyen al escurrimiento del nitrógeno residual a las napas de agua superficiales y subterráneas, favoreciendo así la eutrofización de ríos y lagos (Vance, 2001, Fowler, *et al.*, 2013, Olivares, *et al.*, 2013). Estos son sólo algunos de los costosos efectos producidos por la fertilización química, que evidencian una necesidad de cambio de las prácticas agronómicas a procedimientos sustentables. En este sentido, algunos esfuerzos tecnológicos se orientan a la búsqueda de fertilizantes de liberación lenta e inhibidores de la nitrificación (Cassman, *et al.*, 2002), sin embargo, el mayor interés científico y productivo tiene su atención en la optimización de la utilización del proceso biológico por el cual ciertos organismos reducen el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_3) y lo incorporan en moléculas orgánicas, conocido como **Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN)**.

La posibilidad de bioconvertir el di-nitrógeno atmosférico (N_2) en formas asimilables se encuentra reducida a un grupo de organismos procariotas llamados **diazótrofos** (*di*: dos; *azo*: nitrógeno; *trofo*: alimento). Estos organismos son los responsables de la incorporación de alrededor del 60% del nitrógeno fijado al ciclo de este elemento. Los organismos diazótrofos pueden

encontrarse en una gran variedad de ambientes y si bien son taxonómicamente muy diversos, la maquinaria que utilizan para lograr la reducción del nitrógeno se encuentra muy conservada en todos ellos. Esta maquinaria está formada por un complejo de metalo-enzimas conocido como complejo **nitrogenasa**. La nitrogenasa ha sido muy estudiada a nivel molecular en diferentes organismos (Kim & Rees, 1994, Halbleib & Ludden, 2000, Rees & Howard, 2000) y se caracteriza por ser altamente sensible al oxígeno (O₂), quedando irreversiblemente inactivada por este gas. Por este motivo los diazótrofos llevan a cabo la fijación sólo en ambientes de anaerobiosis o microaerofilia. De acuerdo al ambiente en el que consiguen esa reducción de los niveles de O₂ son clasificados en **a) Fijadores en vida libre**, como bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, y *Klebsiella*; **b) Fijadores asociados**, que pueden fijar nitrógeno sólo en ambientes de microaerofilia generados por la presencia de la raíz de la planta asociada, un ejemplo de esta clase de diazótrofos es el género *Azospirillum*, que es capaz de asociarse a varios miembros de la familia de *Poaceae* (pastos); y finalmente los **c) Fijadores simbióticos**, que sólo son capaces de fijar nitrógeno cuando se encuentran formando parte de una relación simbiótica con una planta huésped. Son parte de este grupo algunos géneros de actinomicetes (*Frankia*) y de cianobacterias (*Anabaena* y *Nostoc*), y el conjunto de α y β -proteobacterias conocidos como rizobios que son capaces de establecer simbiosis con plantas leguminosas (Wagner, 2011).

Si bien todos los organismos diazótrofos que hemos mencionado anteriormente cumplen un rol importante contribuyendo de diferentes maneras al ciclo del nitrógeno, la asociación de los rizobios con las plantas leguminosas es considerada la de mayor importancia ecológica. Las leguminosas son sólo superadas por las gramíneas en lo respecta a importancia alimentaria, constituyendo el 27% de la producción agrícola del mundo (Graham & Vance, 2003). La cantidad de nitrógeno necesario para la agricultura se cree será mayor en las próximas décadas. Hoy, los esfuerzos se orientan a una menor dependencia de la fertilización química hacia prácticas sustentables que favorezcan la FBN y el crecimiento vegetal (biofertilización). Las grandes líneas de trabajo en este sentido pueden clasificarse en tres:

a) La optimización de los sistemas naturales promotores del crecimiento vegetal: Las líneas principales se enfocan en la caracterización detallada de los mecanismos de interacción conocidos hacia la búsqueda de mejores cepas (más competitivas y con mayor eficiencia de fijación). Mucho trabajo está dirigido hacia la búsqueda y caracterización de nuevas cepas promotoras del crecimiento vegetal ("*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*", PGPR). Estas bacterias se establecen en los entornos de la raíz y tienen efectos positivos sobre el crecimiento de la planta asociada (Vessey, 2003).

b) La transferencia de la capacidad de fijación de nitrógeno a otros organismos: Uno de los nuevos intereses biotecnológicos es la ingeniería de plantas (el mayor interés está centrado en los cereales) que puedan expresar su propia nitrogenasa. Los requerimientos para lograr una eficiente fijación son muchos: la fijación de nitrógeno es un proceso complejo, energéticamente costoso, estrictamente regulado y que requiere la generación de un ambiente anóxico por lo que, si bien hay trabajos que han representado grandes avances en este sentido, mucho más trabajo queda aún por ser realizado. (Beatty & Good, 2011, Olivares, *et al.*, 2013, Oldroyd & Dixon, 2014).

c) **El desarrollo de nuevas asociaciones plantas-microorganismos:** La posibilidad de lograr asociaciones simbióticas eficientes entre organismos fijadores y plantas no-leguminosas de interés agronómico es una idea que surgió poco después del descubrimiento de la interacción rizobio-leguminosa (Burrill & Hansen, 1917). Los principales avances en este sentido demostraron la existencia de vías de señalización simbiótica en cereales con paralelismos a las existentes en leguminosas. El desafío primero es entonces trabajar genéticamente sobre la vía de señalización de los cereales para lograr el reconocimiento de los rizobios. Sin embargo y como veremos en las próximas secciones el conocimiento sobre estas vías no es total para el caso de asociaciones simbióticas rizobio-leguminosa, por lo que resta aún mucho camino por recorrer para poder lograr el objetivo. (Charpentier & Oldroyd, 2010, Oldroyd & Dixon, 2014).

I.2. La simbiosis fijadora de nitrógeno rizobio-leguminosa

I.2.1. Generalidades de los rizobios y las plantas leguminosas

Los rizobios son α - y β -proteobacterias habitantes del suelo que han adquirido, por transferencia horizontal de genes la capacidad de asociarse en simbiosis con raíces de plantas leguminosas para formar nódulos radiculares fijadores de nitrógeno atmosférico (MacLean, *et al.*, 2007). Si bien la taxonomía de los rizobios está siendo revisada continuamente, la clasificación actual basada en criterios moleculares, aunque no es definitiva, agrupa a los rizobios en 14 géneros de α -proteobacterias: *Agrobacterium* (*Rhizobium*), *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium*, *Shinella*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*) y 3 géneros de β -proteobacterias: *Burkholderia*, *Cupriavidus*, *Herbaspirillum* (Weir, 2012, <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy>)

Con respecto a la planta, la capacidad de establecer relaciones simbióticas con los rizobios está limitada sólo a la familia *Leguminosae* (*Fabaceae*), con una única excepción conocida presente en el género *Parasponia* de la familia *Cannabaceae* (Trinick & Galbraith, 1980). Las leguminosas representan la tercer familia más grande de plantas con flor y están comprendidas en tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. La diversidad estimada es de más de 20.000 especies distribuidas en 730 géneros. La mayoría de los árboles de las selvas tropicales pertenecen a la familia *Leguminosae* (Wojciechowski, *et al.*, 2004, Cronk, *et al.*, 2006, Cronk, 2006). Esta familia constituye la segunda en importancia agronómica después de las gramíneas (Gepts, *et al.*, 2005), aunque sólo una pequeña fracción del total de especies de este grupo es explotado agronómicamente.

Rizobios y leguminosas se asocian a través de un complejo proceso de señalización que finaliza en la formación de nuevos órganos en las raíces de la planta especializados en la fijación de nitrógeno atmosférico (nódulos). La formación de esta interacción comprende una serie de cambios morfológicos y fisiológicos tanto del rizobio como de su planta huésped, todos procesos sumamente regulados por los interactuantes e influenciados por el ambiente en el que se encuentran. La complejidad es todavía mayor si consideramos que además, esta asociación es específica (es decir, no todos los rizobios puede establecer asociaciones simbióticas con una

leguminosa). A lo largo de las siguientes secciones describiremos las etapas de este complejo proceso, haciendo especial énfasis en los eventos de iniciación de la interacción. Haremos referencia, por lo general, al sistema modelo de interacción *Ensifer (Sinorhizobium) meliloti-Medicago spp*, que es además nuestro sistema de estudio.

I.2.2. Los rizobios y su vida libre

Los rizobios son saprófitos de vida libre capaces de persistir por largos periodos de tiempo en el suelo o en las cercanías de las raíces (Brunel, *et al.*, 1988). En su vida libre, deben incorporar y asimilar un amplio rango de fuentes de carbono que se encuentran en bajas concentraciones, y además deben tolerar y responder a distintos estreses tanto bióticos como abióticos. Dado que estas bacterias no son capaces de esporular, es posible que su permanencia en el suelo dependa de la presencia de nichos favorables a los que puedan colonizar. Un suelo agrícola, en su horizonte superficial, está compuesto por partículas cuyos diámetros varían entre 0,1 μm y 2 mm. La abundancia relativa de cada tamaño de partícula en un suelo define su textura. Además, las partículas se agrupan entre sí formando agregados en una estrecha y definida variedad de formas, lo que constituye la estructura de los suelos (Marshall, *et al.*, 1996). En un suelo de textura media puede esperarse que el 50% del volumen este ocupado por poros de diversos diámetros. Así se divide a los poros en 2 categorías: a) no capilares, los cuales se drenan fácilmente luego del riego o lluvia, y b) capilares, en los que el agua permanece después que el suelo haya sido completamente drenado. El diámetro de los poros capilares puede estimarse en un rango de 0,1 a 6 μm (Hillel, 1971). Estos poros pueden constituirse en microhábitats muy favorables para las bacterias en el suelo. Las bacterias pueden adsorberse a los minerales de arcilla por medio de interacciones hidrofóbicas o electroestáticas, estabilizadas a través de apéndices tales como microfibrillas o fimbrias (Van Loosdrecht, *et al.*, 1990). Los efectos protectores de las superficies sobre la actividad de las bacterias adsorbidas son en general indirectos, pudiendo atribuirse a un mecanismo por el cual el entorno celular se modifica en presencia de una dada superficie, pero la actividad de las células mismas no se modifica. Es posible que la actividad biológica de los rizobios en los poros capilares se encuentre muy disminuida, entre otras razones, por la pobre difusión de oxígeno que ocurriría hacia esos poros cuando el contenido hídrico del suelo es alto.

La capacidad de adaptación de los rizobios a un ambiente tan complejo y heterogéneo como el suelo, sumado a la habilidad de estas bacterias de establecer interacciones simbióticas con las plantas se encuentra reflejada en el tamaño de sus genomas, los cuales tienden a ser grandes y multipartitos, conteniendo un gran número de genes asociados a un metabolismo diverso, al transporte y a la tolerancia a estrés (Mauchline, *et al.*, 2006, Prell & Poole, 2006, MacLean, *et al.*, 2007). Los genes relevantes para la infección y la fijación de nitrógeno, en general, suelen encontrarse agrupados en plásmidos (pSym) o en islas genómicas (SIs, del inglés: Symbiotic Islands) (MacLean, *et al.*, 2007). *S. meliloti* posee un genoma de 6,7 Mb distribuido en tres replicones, un cromosoma de 3,67 Mb y dos megaplásmidos pSymA y pSymB de 1,35 y 1,68 Mb, respectivamente (Galibert, 2001).

Los eventos de vida libre son determinantes de la competitividad y vida simbiótica del rizobio. Este hecho es bien conocido desde hace décadas y quizás el ejemplo más claro lo represente el llamado “problema de la competición”, que es la incapacidad que en algunos casos presentan los rizobios seleccionados por fijar nitrógeno más eficientemente, de competir con las cepas de rizobios nativos. Estos rizobios nativos, parecen encontrarse “adaptados” a esta vida libre y logran ser más competitivos por los nichos de la planta que las cepas seleccionadas, aun cuando los niveles de inóculos exceden los niveles de rizobios indígenas (Triplett and Sadowsky 1992). Evidentemente el conjunto de características adquiridas durante este periodo perfilan al rizobio hacia la interacción con la planta, sin embargo el detalle molecular de este perfil óptimo para una eficiente competición es complejo y difícil de abordar experimentalmente (Schmidt 1979, ver sección I.3). En las siguientes secciones describiremos el complejo entorno que los rizobios habitan haciendo especial énfasis en la interfase de suelo que rodea la raíz (rizósfera) y los eventos iniciales que allí suceden (llegada a la rizósfera, reconocimiento, adhesión).

I.2.3. Eventos iniciales de la interacción rizobio-leguminosa.

Definición, estructura y dinámica de la rizósfera

La rizósfera está definida como el **volumen de suelo que se encuentra bajo la influencia de la raíz**. Si bien el término no es determinante en cuanto al tamaño o forma, se puede decir que consiste en un gradiente de propiedades químicas, físicas y biológicas que cambian radialmente y longitudinalmente a lo largo de la raíz (Prashar, *et al.*, 2013). Su extensión puede variar de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta y su edad, entre otros factores. La definición ha sido ampliada para incluir como parte de la rizósfera a tejidos más externos de la planta que también presentan propiedades diferentes por la actividad de la raíz. Pueden entonces diferenciarse tres zonas dentro de la rizósfera (Figura I.1 A): La **endorizósfera**, que incluye porciones de corteza y endodermis en el que la actividad rizosférica ocupa los espacios libres entre células (espacio apoplástico). El **rizoplano**, que es la zona media directamente adyacente a la raíz (que incluye la epidermis), y la zona de suelo que se encuentra bajo la influencia de la raíz comprendida a partir del rizoplano, llamada **ectorizósfera** (Pinton, *et al.*, 2001, Prashar, *et al.*, 2013).

Las plantas secretan, liberan o exudan a través de sus raíces una gran cantidad de compuestos orgánicos que hacen que el entorno rizosférico sea muy rico en nutrientes. Este conjunto de compuestos orgánicos se conoce como **rizodepósito** (Figura I.1 B) y está formado por compuestos de bajo peso molecular como ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares, compuestos aromáticos, metabolitos secundarios y compuestos de alto peso molecular como el mucílago (azúcares polimerizados), proteínas, polisacáridos y células de la planta (de las capas más externas de la raíz y de la cofia) (Nguyen, 2003, Jones, *et al.*, 2009, Philippot, *et al.*, 2013, el Zahar Haichar, *et al.*, 2014). Si bien es difícil de calcular, se estima que entre el 5 y el 20% del carbono fijado es transferido a la rizósfera a través de estos exudados (Jones, *et al.*, 2009).

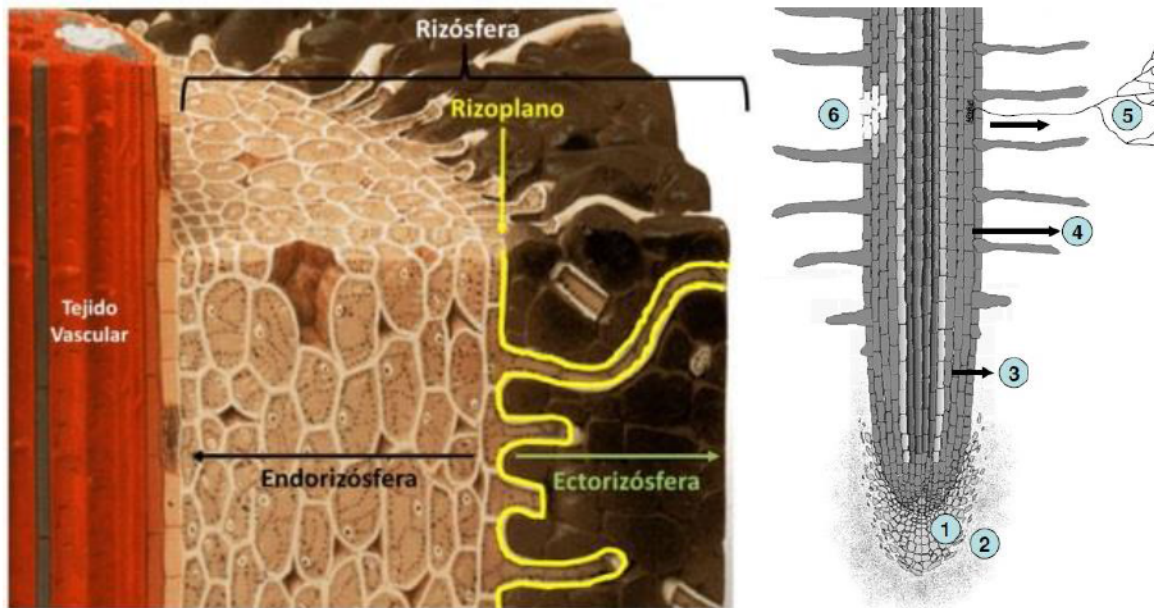


Figura I. 1. Esquema de una sección de rizósfera. Localización de rizodepósitos.

A. Zonas que componen de la rizósfera. La estructura de la rizósfera ha sido subdividida en tres zonas, la endorizósfera, el rizoplano y la ectorizósfera. La gran cantidad de compuestos orgánicos exudados o secretados por la raíz convierten a la rizósfera en una zona de intensa actividad microbiana cuali y cuantitativamente diferente a la que se encuentra por fuera de ella (efecto rizosférico). Imagen adaptada de McNear (2013).

B. Localización de las mayores fuentes de rizodepósitos. 1. Pérdida de células externas y de la cofia. 2. Mucílago. 3. Exudación de compuestos solubles. 4. Liberación de carbono volátil (mayormente respiración) 5. Flujo de carbono hacia micorrizas o simbiontes. 6. Muerte o lisis celular. Tomado de Jones et al (2009).

La mayor disponibilidad de nutrientes hace que la rizósfera sea un entorno favorable para el desarrollo microbiano. La concentración de microorganismos en el ambiente rizosférico es entre uno y dos órdenes de magnitud mayor que en el resto del suelo (10^{10} - 10^{12} células/g de suelo rizosférico), dando lugar al llamado efecto rizosférico (Clark, 1949). El conjunto de genoma de la comunidad bacteriana que rodea la raíz supera en gran magnitud el tamaño del genoma de la propia planta, motivo por el cual ha llegado a llamarse “segundo genoma de la planta” (de manera similar que la comunidad de bacterias colonizante del intestino humano) (Berendsen, *et al.*, 2012, Turner, *et al.*, 2013). En general, la comunidad microbiana que compone la rizósfera es menos diversa que la presente en el suelo. Parece que, a partir del reservorio de microorganismos presentes en el suelo, las raíces pueden seleccionar y regular aquellos organismos que en su entorno prosperan. Así, a través de la secreción de una variedad de aminoácidos, proteínas, azúcares, ácidos orgánicos, flavonoides, carbohidratos complejos, alcoholes, vitaminas y hormonas junto a metabolitos secundarios tales como sustancias antifúngicas, nematicidas y flavonoides, favorecen el desarrollo de las interacciones benéficas por sobre las patógenas. A su vez, la planta utiliza diferentes mecanismos para controlar parámetros fisicoquímicos del entorno rizosférico. Así, a través de la liberación o captación de iones y quelantes, la incorporación de agua y la respiración, la raíz puede regular el pH, la disponibilidad de minerales y la concentración de oxígeno en ese ambiente (Philippot, Raaijmakers *et al.* 2013). Es importante mencionar que la planta no es el único determinante de las propiedades

biofísicoquímicas de la rizósfera, las cuales también son fuertemente dependientes del tipo de suelo y las condiciones ambientales (Philippot, Raaijmakers et al. 2013).

Con el fin de conocer en qué medida la comunidad microbiana colonizante se encuentra influenciada por la planta, Turner et al. (2013) estudiaron el metatranscriptoma del microbioma asociado a la rizósfera de tres plantas distintas (trigo y avena (cereales) y arveja (leguminosa)) cultivadas en el mismo suelo. Los resultados de este trabajo mostraron una abundancia hasta 5 veces mayor de eucariotas en las rizósferas de avena y arveja, en comparación con el suelo o trigo. Por otro lado, el análisis de la comunidad procariota reveló que las tres rizósferas estaban compuestas por diferente proporción de cada género en comparación con el suelo y aún mayores diferencias se evidenciaron cuando las rizósferas fueron comparadas entre sí. Este último resultado sugiere que los microbiomas que componen la rizósfera son específicos de plantas. El microbioma asociado a la leguminosa resultó el más diferente, lo que además permite sugerir un fuerte efecto asociado al tipo de planta (leguminosa o cereal) (Turner, et al., 2013).

En este trabajo también se reveló que los procariotas más abundantes de la población rizosférica pertenecen al filo Proteobacteria (constituyendo aproximadamente el 50% de la población bacteriana), seguido por Actinobacterias, Firmicutes, Acidobacterias, Planctomicetes y Bacteroidetes. Las clases y órdenes de Proteobacterias más abundantes corresponden a Alfa (incluyendo Rhizobiales), Beta (incluyendo Burkholderiales), Gamma (incluyendo Pseudomonadales) y Delta proteobacterias (Turner, et al., 2013).

Perfil transcripcional de los rizobios en la rizósfera

Existen pocos trabajos que han abordado el estudio de genes de los rizobios involucrados en el desarrollo y establecimiento en la rizósfera, principalmente por la dificultad que significa obtener un número suficiente de bacterias que representen el estado fisiológico “promedio” en el que éstas se encuentran. En un trabajo reciente se reportó el perfil transcripcional de una cepa de *R. leguminosarum* biovar *viciae* inoculada sobre arveja (planta huésped) y sobre una planta heteróloga (alfalfa) (Ramachandran, et al., 2011). En este trabajo los autores encontraron 106 genes que al menos triplicaron su cantidad de transcriptos (regulados positivamente) en todas las rizósferas estudiadas, de los cuales el 70% corresponden a proteínas hipotéticas. El análisis de los mecanismos de transporte, metabolismo y funciones celulares transcripcionalmente activos en estas condiciones revelaron un aumento en el transporte de carboxilatos, ricos en la rizósfera, lo que permite sugerir que el metabolismo central de esta bacteria en la rizósfera se encuentra dominado por el catabolismo de estos ácidos orgánicos. Además se vieron aumentados los niveles de transcriptos de transportadores de compuestos aromáticos, inositol y sorbitol/manitol y de oligosacáridos. En varios casos la inducción de transportadores se encontró asociada a la activación del metabolismo de estos compuestos. El catabolismo de fenilalanina y tirosina resultó una vía regulada positivamente en todas las rizósferas estudiadas. En cuanto a los principales mecanismos de adaptación involucrados pueden listarse la degradación de antimicrobianos, la exportación de drogas, el mantenimiento de la homeostasis osmótica, la regulación de *quorum-sensing* y la respuesta a estrés (Ramachandran, et al., 2011).

Llegada a la rizósfera: Quimiotaxis y movilidad

Los rizobios son bacterias móviles, y en general poseen un flagelo polar, y entre dos y seis flagelos peritricos. Si bien la movilidad no es esencial para la nodulación, la misma confiere una ventaja selectiva a los rizobios que compiten frente a bacterias no-móviles (Ames & Bergman, 1981). En la complejidad de este ambiente rizosférico, aquel microorganismo que sea capaz de detectar y responder eficientemente a los exudados de la planta es esperable que tenga una importante ventaja competitiva. Los rizobios son capaces de sentir, a través de sus receptores, numerosos atrayentes presentes en los exudados radiculares incluyendo azúcares, aminoácidos y ácidos dicarboxílicos. El motor flagelar de *S. meliloti* controla la movilidad a través del control de la velocidad de rotación de flagelo, una rotación máxima de todos los flagelos hace que la célula se dirija hacia adelante en tramos rectos. Frente a un estímulo, las bacterias responden disminuyendo la velocidad de rotación individual de cada flagelo, lo impulsa a la célula a generar tumbos (Scharf & Schmitt, 2002, Attmannspacher, *et al.*, 2005). El regulón flagelar de *S. meliloti* se encuentra codificado en el cromosoma y contiene 56 genes responsables de la quimiotaxis, la biosíntesis del flagelo, el motor flagelar y genes regulatorios (Sourjik, *et al.*, 1998, Galibert, 2001). Por otro lado, en regiones diversas del genoma *S. meliloti* se encuentran codificados siete receptores transmembrana del tipo MCP (del inglés *Methyl-accepting Chemotaxis Proteins*). La depleción de cualquiera de estos receptores causa una respuesta quimiotáctica disminuida frente a aminoácidos, azúcares o ácidos orgánicos lo que demuestra que estos receptores son capaces de sentir más de un tipo de molécula y que, posiblemente, trabajan en conjunto (Meier, *et al.*, 2006).

Hemos mencionado entonces, que a fines nutricionales los rizobios sienten y responden a una variedad de compuestos de bajo peso molecular a través de la unión a sus receptores del tipo MCP. Sin embargo, éstos no son las únicas señales capaces de inducir quimiotaxis en rizobios. Se ha demostrado que ciertos flavonoides a muy bajas concentraciones (entre micro y nano molar) son inductores de una respuesta quimiotáctica positiva en rizobios (Caetano-Anollés, *et al.*, 1988b, Muñoz Aguilar, *et al.*, 1988). Sin embargo este tipo de señalización mediada por compuestos fenólicos exudados por la planta genera una respuesta más compleja, que como veremos en las secciones siguientes, es el primer paso de una compleja cascada de señalización e interacción entre la bacteria y la planta.

1.2.4. Moléculas señal y componentes involucrados en las primeras etapas de la interacción rizobio-leguminosa

Tal como mencionamos precedentemente, las plantas leguminosas son capaces de participar en simbiosis con los rizobios del suelo. Esta asociación mutualista es altamente específica, de modo que cada especie rizobiana/cepa interactúa con sólo un grupo específico de leguminosas, y viceversa. Esta marcada especificidad entre el huésped y el microorganismo infectivo es una de las características centrales de las asociaciones entre rizobios y leguminosas. Sin embargo, el rango de especificidad puede ser muy variado (existen algunos rizobios con un rango más extendido de huéspedes (amplio), que son capaces de infectar a varias especies y otros que sólo son capaces de asociarse simbióticamente con una única especie) (Perret, *et al.*, 2000). Estas excepciones a la alta

especificidad incluyen a *Rhizobium* sp. NGR234, que nodula alrededor de 110 géneros de leguminosas (Pueppke & Broughton, 1999) y *Phaseolus vulgaris* L. o la planta de poroto común, que es nodulada por lo menos 20 especies de rizobios (Michiels, *et al.*, 1998). La especificidad se encuentra determinada por varios factores que, como veremos a continuación, involucran moléculas de señalización de ambos interactuantes y además juegan un papel en este sentido los polisacáridos presentes en las paredes bacterianas de los rizobios y las proteínas que estos secretan (Denarie, *et al.*, 1992, van Rhijn & Vanderleyden, 1995, Fauvart & Michiels, 2008, Downie, 2010).

Flavonoides y factores de nodulación (NF)

Los flavonoides son una serie de compuestos aromáticos policíclicos derivados de la 2-fenil-1,4-benzopirona sintetizados por todas las plantas terrestres y, en particular en la simbiosis rizobio-leguminosa, cumplen un importante rol en el comienzo del proceso de señalización entre la bacteria y la planta que finaliza en el desarrollo del hilo de infección y finalmente, en el nódulo maduro fijador de nitrógeno. Los flavonoides son secretados a la rizósfera constantemente, sin embargo, la concentración y los tipos de flavonoides liberados dependen de diversas señales ambientales (disponibilidad de nitrógeno combinado y fosfatos (Coronado, *et al.*, 1995, Juszczuk, *et al.*, 2004) y de la presencia de bacterias compatibles (Dakora, *et al.*, 1993). Estas moléculas son capaces de difundir pasivamente a través de la membrana bacteriana (Wang, *et al.*, 2012) y son reconocidas de manera directa por las proteínas NodD. Estas proteínas constituyen los productos regulatorios de los genes *nodD*, que se expresan en forma constitutiva. Las proteínas NodD son miembros de la familia LysR de reguladores transcripcionales y los rizobios pueden tener entre una y cinco copias de este gen dependiendo de la especie. **Los flavonoides constituyen el primer determinante de especificidad, ya que las diferentes proteínas NodD en diferentes rizobios se encuentran asociadas al reconocimiento específico de diversos flavonoides, isoflavonoides o compuestos relacionados producidos por diferentes leguminosas** (Downie, 2010, Downie, 2014). La unión del regulador NodD con su flavonoide “asociado” activa la transcripción de los denominados genes *nod* (Cooper, 2007). Por ejemplo, el regulador NodD1 de *S. meliloti* es capaz de activar la transcripción de los genes *nod* en presencia de la flavona luteolina (Figura I.2), pero es incapaz de generar activación en presencia de naringenina o eriodictiol. De manera similar, los isoflavonoides daidzeína y genisteína, provenientes de soja, son capaces de inducir los genes *nod* en *Bradyrhizobium japonicum*, sin embargo la daidzeína actúa como inhibidor competitivo de la inducción de genes *nod* en *S. meliloti* (Peck, *et al.*, 2006).

Además de NodD1, en *S. meliloti* existen otras dos proteínas NodD: NodD2 y NodD3. NodD2, al igual que NodD1 es capaz de inducir los genes *nod* en presencia de compuestos derivados de la planta, en cambio NodD3 es activa en ausencia de flavonoides (Perret, *et al.*, 2000, Jones, *et al.*, 2007). Los genes *nod* pueden dividirse en dos grupos, por un lado los genes *nodABC* presentes en todos los rizobios conocidos, que codifican proteínas que son requeridas para la síntesis del esqueleto del factor de nodulación (Factor Nod – NF) y por otro lado un grupo de genes *nod* (y también *noe* y *noI*) que es específico de especie y cuyos productos génicos son responsables de las modificaciones y decoraciones sobre el esqueleto del factor de nodulación (Figura I.2). Además de los

genes *nod*, existen otros genes regulados por NodD. Por ejemplo en *Rhizobium* sp. NGR234, existen 13 cajas *nod* adicionales asociadas a la secreción de proteínas de tipo III, síntesis y modificación de exopolisacáridos, y síntesis de ácido indolacético (Kobayashi, Graven et al. 2004).

Los factores Nod son moléculas de lipoquitooligosacáridos formados por la unión β -1,4 de cuatro o cinco residuos de N-acetil-D-glucosamina cuyo extremo no reductor se encuentra sustituido en el C₂ con un ácido graso. Según la especie de rizobio el largo de la cadena lipídica puede variar, y además pueden presentarse otros sustituyentes. Estas variaciones son vitales para la actividad biológica de los factores Nod y son uno de los mayores determinantes de especificidad de la interacción simbiótica (Spaink, et al., 1991, Spaink, 2000). Los factores Nod pueden inducir una respuesta por parte de la planta a concentraciones tan increíblemente bajas como 10^{-12} M (Oldroyd & Downie, 2004). La estructura del factor Nod mayoritario de *S. meliloti* se encuentra esquematizada en la figura I.2, tal compuesto está formado por cuatro residuos de N-acetil-D-glucosamina y tres sustituyentes, por un lado un sustituyente lipídico de 16 carbonos con dos insaturaciones (C16:2) agregado al esqueleto oligosacáridico por las proteínas NodF y NodE, un sustituyente acetilo agregado al azúcar terminal no reductor por NodL y un sustituyente sulfatado en el azúcar terminal reductor agregado por los productos de los genes *nodHPQ* (Roche, et al., 1991, Dénarié, et al., 1996). Ha sido demostrado que la sulfatación del factor Nod de *S. meliloti* es esencial para la nodulación de

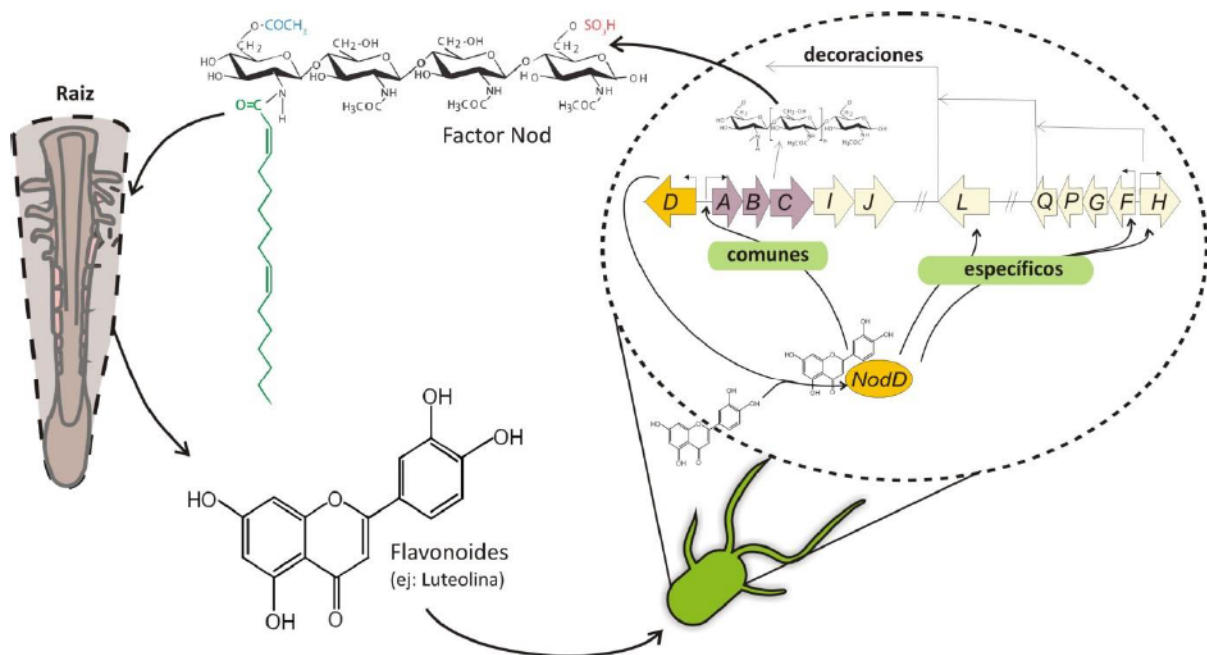


Figura I. 2. Comienzo del proceso de señalización entre los rizobios y las plantas leguminosas.

En presencia de bacterias compatibles, los flavonoides son capaces de unirse al regulador transcripcional NodD, constitutivamente expresados en rizobios, y activan la transcripción de los genes *nod*. Los genes *nodABC* (en violáceo), codifican proteínas requeridas para la síntesis del esqueleto de oligosacárido de β -1,4 N-acetil-D-glucosamina. Los productos de los otros genes *nod* (además de los genes *noe* y *nol*), le confieren especificidad al factor de nodulación, a través del agregado de decoraciones específicas de especie. En el esquema se presenta el flavonoide luteolina, capaz de inducir la expresión de los genes *nod* en *S. meliloti* y el factor de nodulación mayoritario en esta especie. Además de los genes *nod*, existen otros genes adicionales regulados por NodD (ver texto).

alfalfa. Mutantes en el gen *nodH*, pierden la capacidad de nodular alfalfa pero pueden nodular arveja (Roche, *et al.*, 1991, Downie, 1998). Los productos de los genes *nodI* y *nodJ* se encuentran involucrados en la exportación de los factores nod (Spaink, *et al.*, 1995).

El esquema de intercambio de señales que hemos presentado hasta aquí involucra dos señales: los flavonoides liberados por la planta, y los factores Nod, sintetizados por la bacteria en respuesta a la señal de la planta (Figura 1.2.). Sin embargo, este panorama se ha complejizado y hoy se sabe que son muchas más las señales derivadas de la planta con capacidad de inducir los genes *nod*, entre ellas las betaínas, ácidos aldónicos, xantonas, algunos compuestos fenólicos simples y el jasmonato. Por otro lado además de los factores Nod, los rizobios utilizan otros métodos de comunicación con la planta y su entorno. Este conjunto de moléculas incluyen proteínas estructurales, extracelulares y secretadas, acil-homoserin lactonas, pequeñas moléculas como la bradioxetina, hopanoides, lumicromo, ácido indolacético. Estas moléculas cumplen su rol en una serie de procesos que son importantes todos, para una buena eficiencia y competitividad simbiótica. Las funciones incluyen la supresión de la respuesta de defensa de la planta, la promoción del crecimiento y la respiración vegetal, la resistencia a estrés de la misma bacteria, formación de biofilm, entre otras (Cooper, 2007, Downie, 2010).

Otros determinantes de especificidad:

Proteínas secretadas por los rizobios a través de sistemas de secreción de tipo I, III, IV y VI.

Además de los flavonoides y factores de nodulación, en ciertas leguminosas la especificidad se encuentra regulada a otro nivel, que incluye proteínas de rizobio secretadas por los sistemas de secreción del tipo I, III, IV y VI. Si bien los mecanismos de acción de estas proteínas no están completamente dilucidados, se cree que su rol es complementar la señal inducida por los factores Nod (Downie, 2014).

Un mecanismo caracterizado en sólo dos especies de rizobios (*R. leguminosarum* bv. *viciae* y *Rhizobium* sp *BR816*) es la secreción, a través del sistema de secreción del tipo I, de la proteína de unión a Ca^{+2} , NodO. La transcripción del gen *nodO* se encuentra regulada por flavonoides y NodD. Se ha demostrado que la secreción de NodO extiende el rango de hospedador (Economou, *et al.*, 1994, Vlassak, *et al.*, 1998).

El segundo mecanismo involucra proteínas de secreción denominadas Nop (del inglés: *Nodulation Outer Proteins*) secretadas por el sistema de secreción de tipo III. Los genes que codifican para las proteínas Nop y el sistema de transporte tipo III son inducidos por NodD y flavonoides, a través del activador transcripcional *ttsI* que regula la transcripción por medio de su unión a promotores especiales, las cajas *tts*. El rol de estas Nop en la nodulación es dependiente de la planta huésped y una misma proteína puede producir un efecto positivo, negativo o nulo en la nodulación (Marie, *et al.*, 2003, Janczarek, *et al.*, 2014).

Se ha descrito que también los sistemas de secreción de tipo IV (T4SS) y VI (T6SS) juegan un rol en la competencia y la especificidad de la interacción para ciertas interacciones particulares. Por ejemplo, se ha encontrado que la pérdida del T4SS en *Mesorhizobium loti* hace que no pueda

competir eficientemente por la ocupación de nódulos en *Lotos japonicus*, sin embargo, es capaz de nodular *Leucaena leucocephala*, una planta heteróloga (Hubber, *et al.*, 2004). Los sistemas de secreción de tipo VI fueron descubiertos recientemente, siendo una proteína de tipo RbsB de *R. leguminosarum* la única proteína secretada descrita, cuyo rol en la simbiosis es desconocido (Fauvert & Michiels, 2008). En base al análisis de secuencias genómicas, Bingle *et al.* (2008) han reportado la presencia de T6SS en al menos tres géneros de rizobios. Además de *R. leguminosarum*, también se encontraron secuencias conservadas de T6SS en los genomas de *B. japonicum* y *M. loti* (Bingle, *et al.*, 2008). A raíz del reciente interés de los T6SS en bacterias patógenas, este hallazgo representa otra oportunidad para comparar la conservación funcional de las vías de secreción en patogénesis y simbiosis.

Polisacáridos

Desde el punto de vista de la planta la iniciación de la infección es un punto determinante en el que será clave distinguir simbiosis de posibles patógenos. En este sentido, además de la especificidad estructural de los factores Nod, y para ciertos casos particulares la liberación de proteínas específicas, la infección requiere de polisacáridos superficiales que tienen una importante participación en el reconocimiento del huésped antes y durante el proceso de infección. Los rizobios producen varios tipos de polisacáridos, entre los cuales los que más han sido estudiados son exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS), polisacárido capsular (KPS), glucanos cíclicos (CG) y celulosa.

Los exopolisacáridos (EPS) son liberados en grandes cantidades al espacio extracelular y consisten en subunidades repetitivas de monosacáridos comunes sustituidos con grupos que en general, le otorgan una naturaleza ácida. *S. meliloti* produce succinoglucano (EPS I) formado por unidades de octasacáridos compuestos por un residuo de galactosa y siete residuos glucosa, decorado por grupos succinil, acetil o piruvil. Además, produce galactoglucano (EPS II) formado por unidades repetitivas de un disacárido compuesto por una glucosa acetilada y una galactosa piruvilada unidos por enlaces glicosídicos α -1,3 y β -1,3. Ambos exopolisacáridos pueden encontrarse como monómeros, dímeros o trímeros que componen la fracción de bajo peso molecular (LMW, del inglés *Low Molecular Weight*) o como polímeros de entre 10^6 y 10^7 Da (HMW, del inglés *High Molecular Weight*). La forma biológicamente activa como señal en la simbiosis es la LMW (Wang, *et al.*, 1999). Los EPS también tienen su rol en la especificidad, por ejemplo, cualquiera de los EPS es capaz de mediar la infección de alfalfa (*Medicago sativa*), pero las infecciones mediadas por EPS I son más eficientes. Por otro lado, en la infección de *Medicago truncatula* es esencial la presencia de EPS I (Pellock, *et al.*, 2000). Además se actúan como molécula de señalización durante los primeros estadios de interacción, los exopolisacáridos participan durante el desarrollo del hilo de infección y modulan las señales de defensa de la planta (Cheng & Walker, 1998, Fraysse, *et al.*, 2003, Jones, *et al.*, 2007).

Por otro lado, *S. meliloti* produce polisacáridos capsulares (KPS), formados por unidades repetitivas de una hexosa unida a ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico (Kdo) u otros azúcares relacionados. A diferencia de los EPS, estas moléculas se encuentran fuertemente asociadas a la

membrana externa (Frayse, *et al.*, 2003). En *S. meliloti* KPS es suficiente para mediar la infección de alfalfa en ausencia de EPSI y EPSII, aunque los hilos de infección presentan morfologías anormales (Pellock, *et al.*, 2000). En cambio, en la interacción *S. fredii* – soja, parece ser tiene efectos más drásticos la ausencia de KPS que la de succinoglucano (Parada, *et al.*, 2006). **Evidentemente, el tipo de polisacárido reconocido por las diferentes especies de plantas puede variar significativamente.**

El rol de los polisacáridos en la vida libre y simbiótica de los rizobios es muy amplio. Además de ser responsables varias funciones no específicas como protección frente a estrés, la captación de nutrientes y la adhesión, funcionan como moléculas de señalización en las etapas tempranas de interacción, y también son esenciales para el desarrollo de los nódulos, en donde juegan un papel relevante los LPS (Frayse, *et al.*, 2003). En esta sección hemos hecho especial hincapié en el rol de los polisacáridos como determinantes de especificidad, cuando se requiera en las siguientes secciones se comentará más detalladamente su rol en las etapas más avanzadas del proceso simbiótico.

Adhesión y colonización

Los rizobios cuentan con múltiples mecanismos, que incluyen polisacáridos y proteínas extracelulares o de superficie, que les permite adherirse a la raíz y de esa manera exponerse de forma óptima a los exudados de la planta. El rol de cada uno de los mecanismos es dependiente de varios factores entre ellos, el pH, las condiciones de crecimiento y la concentración de Ca^{+2} y Mg^{+2} (Caetano-Anollés, *et al.*, 1989, Rodríguez-Navarro, *et al.*, 2007). Se ha propuesto que la adhesión de los rizobios en la superficie de la planta es un proceso en dos etapas, la primera consta de una adhesión laxa y reversible que involucra lectinas de la planta y polisacáridos bacterianos. La segunda, implica la unión más firme e irreversible de los rizobios a la punta de los pelos radiculares a través de la síntesis de fibrillas de celulosa que causan la formación de agregados bacterianos en la superficie de la planta (Rodríguez-Navarro, *et al.*, 2007, Downie, 2010). Si bien la adhesión es necesaria para la competencia por la ocupación de los nódulos, los efectos de las mutaciones en las distintas etapas y genes que intervienen en el proceso son variados (Williams, *et al.*, 2008).

Además de los polisacáridos superficiales, la ricadhesina, una proteína secretada dependiente de Ca^{+2} cumple un rol dominante en la adhesión primaria a pH ligeramente alcalino (Rodríguez-Navarro, *et al.*, 2007). Por otro lado se han caracterizado otro un conjunto de adhesinas secretadas por el sistema de secreción de tipo I, denominadas proteínas adherentes de rizobios (RAPs), que reconocen polisacáridos superficiales de las bacterias y se encuentran involucradas en la unión de bacterias entre sí, cumpliendo su rol en la segunda etapa de asociación y agregación de las bacterias en la punta de los pelos radicales (Downie, 2010).

I.2.5. Percepción de los factores Nod y respuestas de la planta

La formación del nódulo fijador de nitrógeno es el resultado de dos eventos coordinados, por un lado la infección del rizobio en las células del pelo radicular del huésped y por el otro lado la activación de divisiones celulares de las células corticales que permiten el desarrollo del nuevo órgano (Oldroyd & Downie, 2008). Estos procesos comienzan con intercambio de señales que hemos

descrito anteriormente. La base genética de la especificidad de la simbiosis mutualista rizobio-leguminosa hace que la interacción se establezca sólo si la planta dispone del receptor capaz de reconocer el correspondiente factor Nod sintetizado por la bacteria. En esta sección nos dedicaremos a la descripción de los eventos que ocurren una vez que los factores Nod son reconocidos por la planta huésped, los cuales han sido estudiados con más detalle en *Medicago truncatula*, por lo que utilizaremos este modelo para describir la señalización.

Los factores Nod se unen a los dominios extracelulares tipo LysM de los receptores quinasas presentes en la membrana plasmática de las células epidérmicas (NFT y LYK3). El reconocimiento del NF por parte de este complejo de receptores, inducido a concentraciones del orden de picomolares, activa la actividad quinasa de los mismos. En el proceso se encuentran también involucradas ciertas proteínas de membrana (remorinas) que podrían intervenir en la regulación de la infección y la nodulación (Lefebvre, *et al.*, 2010). También en la membrana hay un receptor con repeticiones ricas en leucina (LRR, del inglés *leucine rich receptor*), denominado DMI2, cuya función no ha sido completamente dilucidada pero se cree que actúa como un co-receptor. El dominio quinasa de DMI2 es capaz de interactuar con 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa), que activa una señal secundaria (presumiblemente mevalonato). Como respuesta al reconocimiento del NF y mediado por esta señal secundaria, se activan oscilaciones de Ca^{+2} dentro y alrededor del núcleo (fenómeno conocido como *spiking*) (Figura I.3). Si bien no es aún del todo claro cómo se producen las oscilaciones, se cree que el espacio perinuclear actúa como reservorio de Ca^{+2} y que la señal secundaria es capaz de activar canales de eflujo e influjo Ca^{+2} y otro de K^{+} que se encuentran en las membranas nucleares. El *spiking* de Ca^{+2} activa una quinasa dependiente de Ca^{+2} y calmodulina (CCaMK, codificada por *DMI3*). CCaMK fosforila factores de transcripción (CYCLOPS) requeridos para la expresión de reguladores transcripcionales asociados a la formación del hilo de infección y desarrollo de los nódulos (NIN) (Oldroyd & Downie, 2008, Oldroyd, 2013, Downie, 2014).

La regulación de la expresión de NIN es compleja porque además requiere de la unión de otros dos factores de transcripción (NSP1 y NSP2, figura I.3). Una vez activa, NIN se une a dos componentes de un factor nuclear y promueve la progresión el ciclo celular. **Esta inducción es importante tanto para la iniciación de la infección como para la activación de la división celular de las células corticales.** Una vez percibida, la señal debe ser trasladada desde las células epidérmicas hasta las corticales donde se inicia la morfogénesis del nódulo, en este rol parecen ser importantes las citoquininas y auxinas (Oldroyd, *et al.*, 2011).

La cascada de señalización descrita es necesaria, pero no suficiente, para que se produzca la infección. Adicionalmente a las señales activadas por CCaMK, la infección requiere una respuesta más rigurosa, también generada por el reconocimiento del NF pero a concentraciones más altas (nanomolares). Esta respuesta incluye la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), junto con una despolarización de la membrana causada por el flujo de Ca^{+2} hacia el interior de la célula (Figura I.3.) y más allá de los receptores de membrana, no está asociada a ninguno de los componentes de la vía de señalización que conduce al *spiking* de Ca^{+2} (Moriari, *et al.*, 2013). Se propone que la presencia de bacterias en la punta del pelo produce una acumulación de NF (mayor concentración) que es la que desencadena esta vía, que regula la dinámica del citoesqueleto, el

tráfico vesicular y la señalización de lípidos asociada con el crecimiento apical y el desarrollo del hilo de infección (Moriei, *et al.*, 2013).

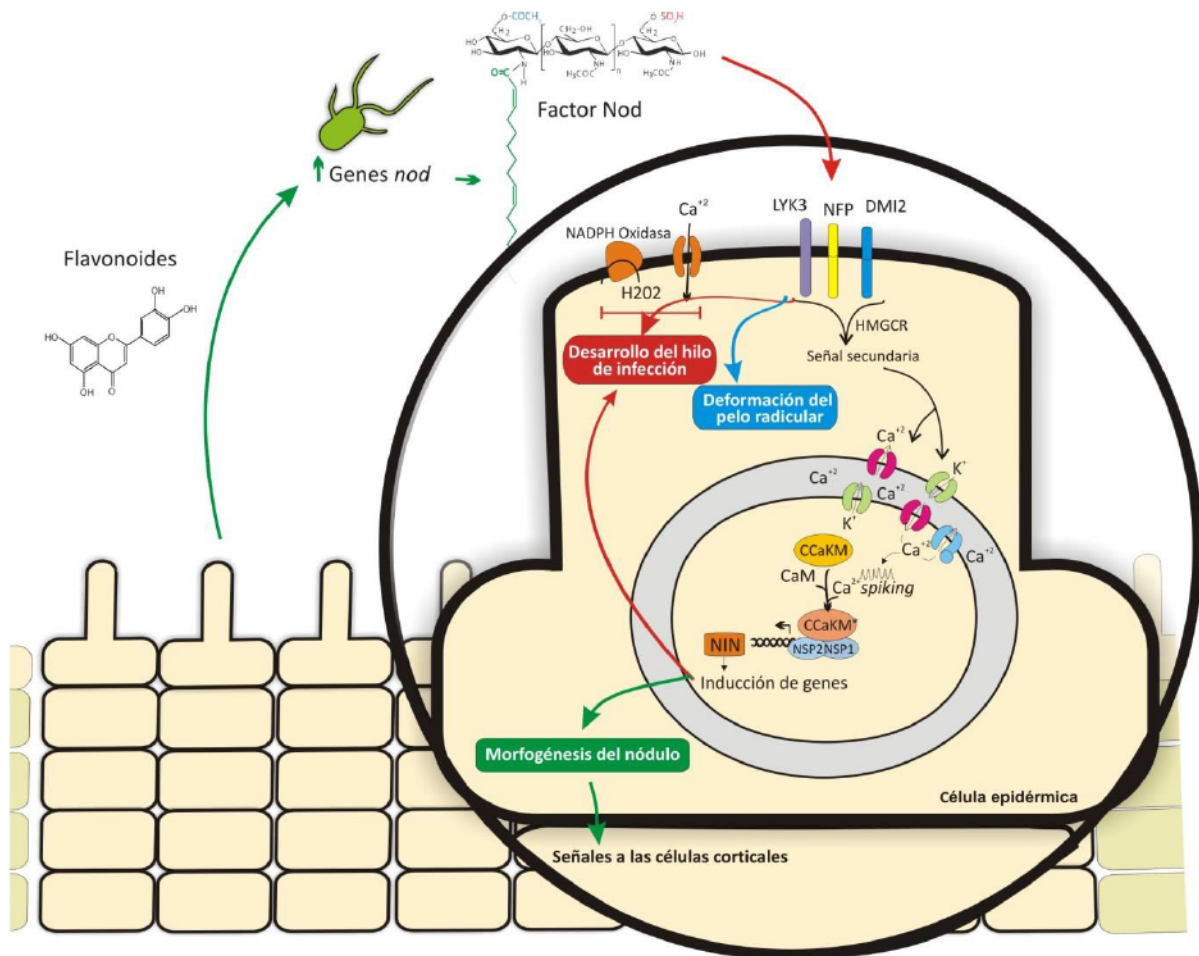


Figura I. 3. Modelo de señalización inducido en las células epidérmicas de *Medicago truncatula* por la percepción de factores Nod compatibles.

El reconocimiento de los factores Nod por los receptores NFP y LYK3 activa dos vías, por un lado una asociada a la morfogénesis del nódulo y otra involucrada en el proceso de infección. En la vía de señalización que conduce el desarrollo del nódulo el receptor quinasa DMI2 interacciona con 3-hidroxy-3-metilglutaril-CoA-reductasa que, presumiblemente a través de un segundo mensajero activa la apertura de canales de Ca^{2+} y K^+ que producen oscilaciones (*spiking*) de Ca^{2+} dentro y alrededor del núcleo. El espacio perinuclear actúa como reservorio de Ca. El *spiking* de Ca^{2+} activa una quinasa dependiente de Ca^{2+} y calmodulina que fosforila el activador transcripcional CYCLOPS, el cual regula la expresión de reguladores transcripcionales (NIN), lo que resulta en la inducción de la morfogénesis del nódulo. La señal activada en las células epidérmicas es enviada a las células corticales a través de citoquininas y auxinas. La infección, sin embargo, requiere la cascada de señalización antes mencionada pero además requiere de la otra vía desencadenada por los NF. La activación de esta otra vía se cree que requiere una ROP-GTPasa que se une a NFP y activa la producción de especies reactivas de oxígeno por NADPH oxidasa y un influjo de Ca^{2+} en la punta de los pelos radiculares. Esta cascada de señalización regula la dinámica del citoesqueleto, el tráfico vesicular y la señalización de lípidos asociados con el crecimiento apical y el desarrollo del hilo de infección.

1.2.6 Desarrollo y progresión del hilo de infección

Para asociarse con la planta, la bacteria debe de alguna manera penetrar los tejidos de la raíz y para hacerlo utiliza una estructuras llamadas hilos de infección (IT, del inglés *Infection Threads*). La formación de los hilos de infección intracelulares comienza con la percepción de los NF, lo que desencadena una respuesta asociada con la inhibición del crecimiento del pelo radicular seguido por la iniciación del crecimiento asimétrico (Figura 1.3). Este tipo de crecimiento resulta en un *enrullamiento* del pelo radicular alrededor de la bacteria adherida (Figura 1.4)(Esseling, *et al.*, 2003, Oldroyd & Downie, 2008). La proliferación de la bacteria atrapada en el pelo radicular enrulado, resulta en la acumulación de NF que activa las vías de infección. Posteriormente, lo que ocurre es básicamente una invaginación de la membrana de las células de la planta y un cambio del sentido del crecimiento del pelo radicular que forma un túnel intracelular. La bacteria crece en esta estructura tubular dentro y a través de las células vegetales, formando una columna de bacterias (Jones, *et al.*, 2007). Si más de una bacteria queda atrapada, el proceso de formación del IT tiende a seleccionar un solo tipo, por lo que, en general, la infección proviene de una única bacteria (clonal) (Gage, 2002). La formación del hilo de infección es un paso determinante en donde la planta impone varias barreras para evitar posibles infecciones de patógenos, en este sentido, además de la especificidad de los factores Nod juegan un rol importante en el reconocimiento y como moléculas de señalización las formas de bajo peso molecular de los polisacáridos EPSI y EPSII y también los glucanos cíclicos (Figura 1.4.)(Pellock, *et al.*, 2000). Si bien no han sido encontrado los receptores, se cree que estas moléculas intervienen en la supresión de la respuesta inmune de la planta (Gibson, *et al.*, 2008, Downie, 2010). En *S. meliloti* el succinoglicano es esencial para la iniciación y progresión del hilo de infección (Cheng & Walker, 1998, Jones, *et al.*, 2008).

En lo que a la planta respecta, la formación del hilo de infección requiere además de los receptores nombrados, varios genes asociados a otros procesos, como la degradación localizada de la pared para la infección, la síntesis de la pared y membrana vegetal que rodea al hilo de infección y varios genes regulatorios.

1.2.7. Diferenciación y supervivencia

Como hemos mencionado anteriormente, la epidermis controla la infección mientras que las citoquininas y auxinas llevan la señal a las células corticales para iniciar la división celular que conduce la formación del meristema del nódulo (Oldroyd, *et al.*, 2011). A través de las sucesivas divisiones de la bacteria, el hilo de infección llega finalmente a la región cortical donde se ramifica (Figura 1.4). Una vez alcanzado el primordio de nódulo las bacterias son endocitadas en compartimentos individuales, sin pared celular, que se originan desde el hilo de infección (Figura 1.4). La estructura de bacteria rodeada por membrana se denomina simbiosoma. La membrana del simbiosoma, llamada membrana peribacteroidea, tiene características particulares derivadas tanto de la bacteria como de la célula huésped y tiene un papel central en el intercambio de nutrientes (Udvardi & Day, 1997). La liberación desde los hilos de infección requiere el gen *hemA*, involucrado en la síntesis del grupo hemo, que es requerido por varias proteínas necesarias para la simbiosis, sobre todo la proteína sensor de oxígeno FixL (Figura 1.4)(Dickstein, *et al.*, 1991). Dentro del

simbiosoma los rizobios se diferencian en una forma fijadora de nitrógeno llamada bacteroide. La diferenciación es un proceso irreversible que implica la replicación del genoma pero sin división celular (“endoreduplicación”), y cambio de la morfología celular a una forma ramificada, similar a una Y (Figura I. 4.). La endoreduplicación requiere alta cantidad de desoxiribonucleótidos (dNTPs) sintetizados por la ribonucleótido reductasa (RNR). *S. meliloti* posee una copia única de RNR. Esta enzima, es dependiente de vitamina B12 por lo que mutantes del gen *bluB* (5,6-dimetilbenzimidazol sintasa), necesario para la síntesis de vitamina B12, no son capaces de diferenciarse a bacteroides, y por lo tanto, no realizan fijación de nitrógeno (Campbell, *et al.*, 2006).

La superficie de la bacteria está en íntima relación con el huésped durante toda la interacción simbiótica y este contacto se vuelve definitivo y más estrecho en el simbiosoma. No es sorprendente entonces que los componentes de la superficie bacteriana sean importantes para promover la adaptación y supervivencia de los rizobios durante la simbiosis. Los lipopolisacáridos (LPS) son un

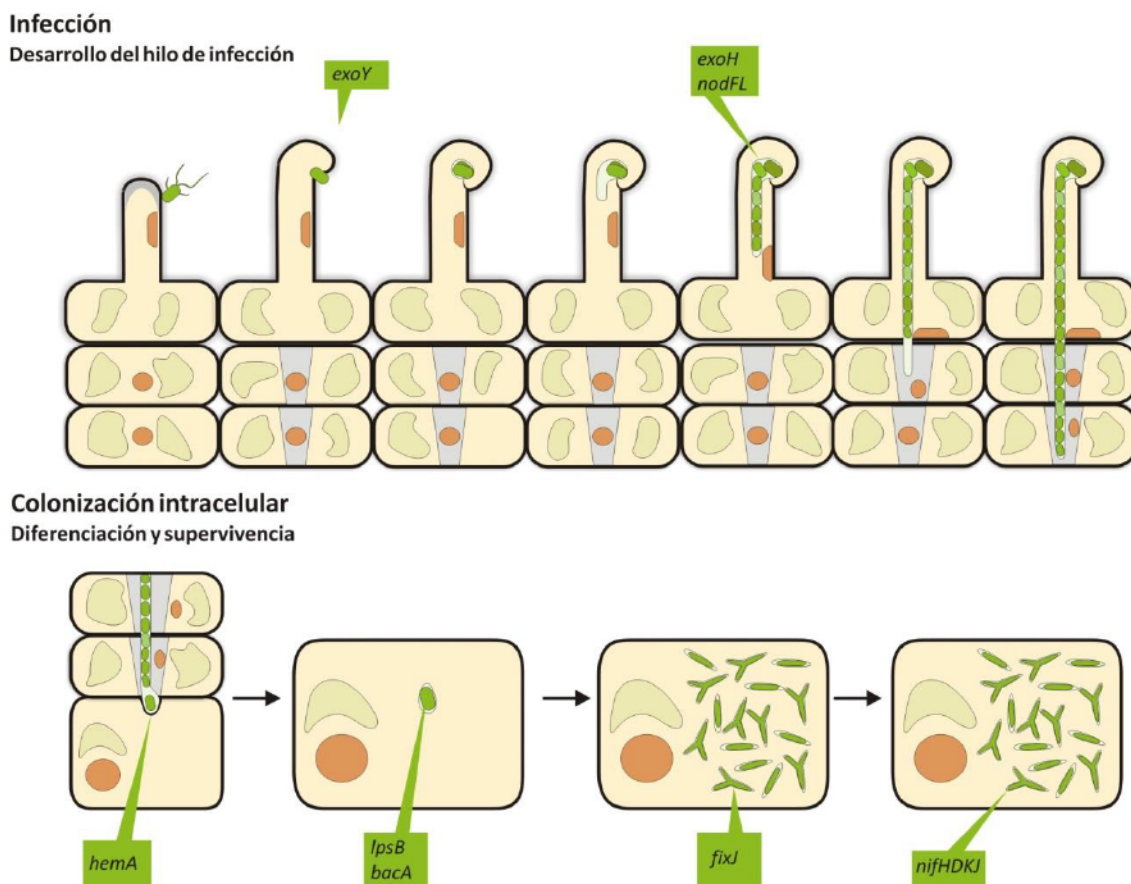


Figura I. 4. Infección y colonización intracelular.

Infección: Para penetrar los tejidos de la raíz la bacteria utiliza estructuras llamadas hilos de infección (IT). El crecimiento asimétrico del pelo radicular produce un enrollamiento sobre la bacteria adherida. La proliferación de la bacteria atrapada en el pelo radicular enrollado, resulta en la acumulación de NF que activa las vías de infección. Además de los NF la infección requiere de la forma LMW de los polisacáridos EPSI y EPSII y también los glucanos cíclicos. **Colonización intracelular:** Una vez alcanzado el primordio de nódulo las bacterias son endocitadas en compartimentos individuales, sin pared celular, que se originan desde el hilo de infección, formando los simbiosomas. La liberación desde los hilos de infección requiere el gen *hemA* de *S. meliloti*. Los genes *lpsB* y *bacA* son necesarios para la supervivencia del rizobio dentro del simbiosoma. La diferenciación es un proceso irreversible que implica la endoreduplicación del genoma y un cambio asociado de la morfología celular a una forma ramificada.

componente mayoritario de las membranas externas de bacterias gram-negativas y están compuestos por un lípido A, un core oligosacárido y un polisacárido O. El lípido A de rizobios presenta la particularidad de estar modificado por unión de un ácido graso de cadena muy larga VLCFA (del inglés: *very long chain fatty acid*). Varios trabajos han demostrado que los LPS son principalmente importantes en las etapas más avanzadas de la simbiosis (Frayse, *et al.*, 2003). Por un lado ha sido demostrado que el LPS de *S. meliloti* actúa como una señal específica en la supresión de la respuesta de defensa de la planta (Albus, *et al.*, 2001). Por otro lado, un mutante de *S. meliloti* en el gen *lpsB*, codificante de una glicosil transferasa involucrada en la biosíntesis del componente polisacárido, ha demostrado encontrarse afectado en la competitividad por la ocupación frente a la bacteria salvaje en nódulos de *Medicago sativa* pero mantiene la capacidad de fijar nitrógeno en este huésped (Lagares, *et al.*, 1992). Sin embargo el mismo mutante es incapaz de fijar nitrógeno en *Medicago truncatula* (Niehaus, *et al.*, 1998), sugiriendo además que las diferentes plantas requieren diferentes estructuras para llevar a cabo la simbiosis.

Para la fijación de nitrógeno, la planta debe proveerle al simbiosoma un ambiente microaerófilico para que la nitrogenasa, altamente sensible al oxígeno, pueda encontrarse activa. Para controlar la permeabilidad al oxígeno en las células del nódulo, la planta utiliza proteínas de unión a oxígeno llamadas leghemoglobinas, las cuales reducen la concentración de oxígeno libre en la zona de fijación, y son responsables del color rosado de los nódulos fijadores (Ott, *et al.*, 2005). En estas condiciones, los bacteroides se encuentran en condiciones de expresar las enzimas del complejo nitrogenasa y comenzar a fijar nitrógeno. La expresión de la nitrogenasa y de los genes involucrados con la cadena respiratoria se encuentra regulada por el sistema de dos componentes FixJL y por las proteínas regulatorias NifA, σ^{54} y FixK (Figura 1.4)(Fischer, 1994). Esta cascada regulatoria es también responsable de la regulación negativa de la gran mayoría de los procesos metabólicos junto con la activación de los genes para la utilización de ácidos dicarboxílicos que constituyen la mayor fuente de carbono en el simbiosoma (Becker, *et al.*, 2004, Udvardi & Poole, 2013).

La reacción de fijación de N_2 consiste en la reducción de esta molécula a amonio por parte de los rizobios. La mayor parte de éste es metabolizado posteriormente, en el citosol de las células vegetales, a los aminoácidos glutamina y glutamato, por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintetasa. Los aminoácidos producidos pasan al xilema y se distribuyen al resto de la planta (Udvardi & Poole, 2013). El proceso de FBN está catalizado por la enzima nitrogenasa que está formada por dos componentes proteicos, el dímero de componente II (ferroproteína) y el tetrámero de componente I (molibdo-ferroproteína). Para que la nitrogenasa actúe como catalizador de la reacción necesita ser activada por ATP que se hidroliza dando ADP y fosfato inorgánico. La cantidad de ATP utilizado por mol de nitrógeno reducido es variable según las condiciones y se estima entre 15-25 moles (Poole & Allaway, 2000).

Factores de la planta que dirigen la diferenciación

En el largo y complejo proceso simbiótico antes descrito las infecciones ocurren a través de la generación del IT, sincronizado con una activación de ciclo celular en la corteza. Dichos eventos llevan a la formación de un primordio de nódulo. Cuando las bacterias alojadas en el IT llegan al primordio de nódulo son incorporadas en simbiosomas y se diferencian irreversiblemente a bacteroides. En las plantas donde ocurre esta diferenciación terminal el tipo de nódulos formados se llaman indeterminados (Figura 1.5.) (Gibson, *et al.*, 2008). Los nódulos indeterminados tienen un meristema apical, que continuamente genera poblaciones de células que entran en proceso de diferenciación, lo que resulta en un crecimiento continuo que produce nódulos de forma cilíndrica, elongada. En estos nódulos pueden diferenciarse distintas zonas: I, meristema; II, zona de infección, III, zona de fijación de nitrógeno, IV, zona senescente (Gibson, *et al.*, 2008, Terpolilli, *et al.*, 2012). Este tipo de nódulos se forman en especies que se encuentran en el clado IRLC (del inglés *Inverted Repeat Lacking Clade*), dentro del cual se encuentran especies como *Medicago*, *Pisum*, *Vicia*, *Galega*, y *Astragalus*. Sin embargo, en las especies de leguminosas no pertenecientes a este clado (NO-IRLC), el tipo de nódulo que se produce es diferente, llamado determinado (Figura 1.5.). En este clado se encuentran especies como *Lotus*, *Phaseolus*, *Glycine*, y *Vigna*. En los nódulos determinados el meristema es temporal y el crecimiento del nódulo sucede por un crecimiento celular, más que por un aumento en el número de células. En este caso los bacteroides son diferenciados reversiblemente, y no endoreduplican su genoma. La diferenciación en un tipo de bacteroide u otro está determinada exclusivamente por la planta, y son los péptidos de la planta (ricos en cisteína (NCR) o ricos en glicina (GRP)) los que dirigen esta diferenciación terminal (Mergaert, *et al.*, 2006, Van de Velde, *et al.*, 2010).

Si bien no se sabe cómo estos péptidos median la diferenciación se ha demostrado que la proteína BacA de los rizobios juega un rol importante. Mutantes de *R. leguminosarum* cepa 3841 en el gen *bacA* son capaces de fijar nitrógeno normalmente en *Phaseolus vulgaris* pero son incapaces de formar nódulos indeterminados en *Pisum sativum* (Karunakaran, *et al.*, 2010). El gen *bacA* es codificante de un dominio transmembrana de un transportador ABC de membrana interna, sin embargo los compuestos exportados o importados por BacA no son conocidos. En mutantes *bacA* el desarrollo de hilos de infección es normal, pero una vez formado el simbiosoma el rizobio muere (Glazebrook, *et al.*, 1993). En vida libre los mutantes *bacA* tienen una estructura de membrana alterada (Ferguson, *et al.*, 2002), presentan mayor sensibilidad a detergentes, una mayor resistencia a péptidos antimicrobianos (bleomicina y glucopéptidos) (Ichige & Walker, 1997, Dagan, *et al.*, 2008) y una reducida incorporación de VLCFA al lípido A de los LPS (el 50% de los LPS carece de VLCFA) (Ferguson, *et al.*, 2004). Si bien con esta información no se ha llegado a un modelo exacto de como BacA interviene en la diferenciación, se cree esta proteína está involucrada en el transporte de uno o más compuestos requeridos para la modificación y/o síntesis de los componentes de la membrana celular y que de esta manera protege a la célula del efecto de estos péptidos y además sirve como señal para el huésped para permitir la diferenciación (Kondorosí, *et al.*, 2013).

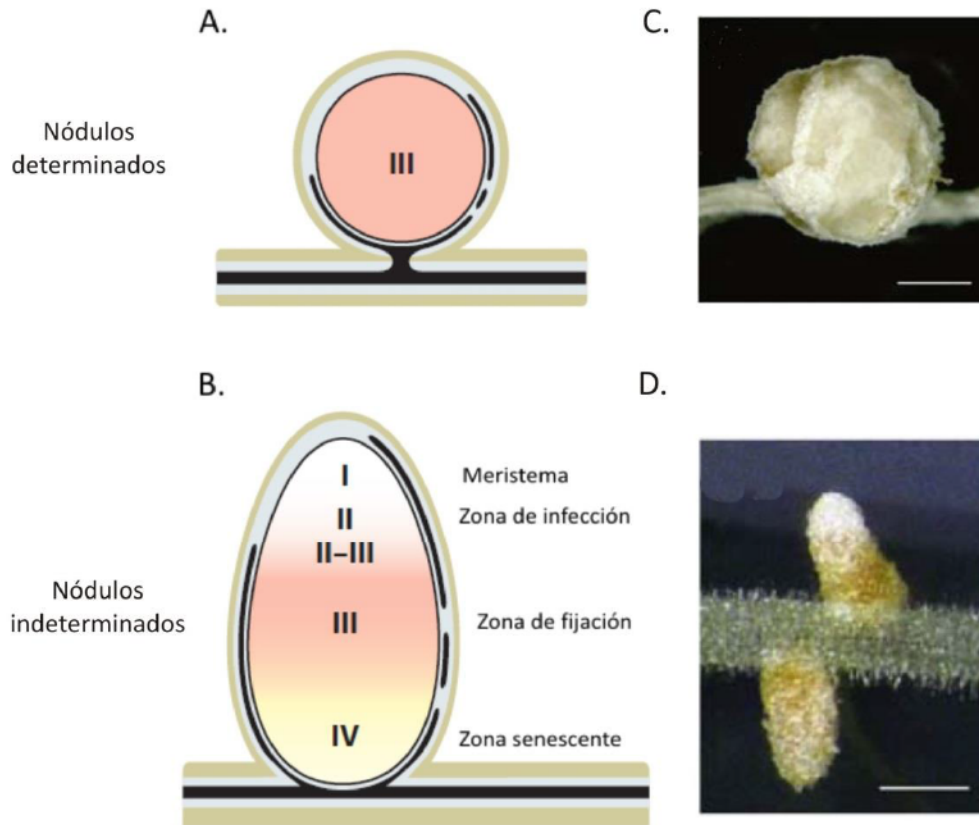


Figura I. 5. Desarrollo de nódulos determinados e indeterminados.

Las figuras A y B representan un esquema de la estructura de nódulos determinados e indeterminados, respectivamente. A. Los nódulos determinados tienen una morfología esférica y una región central que contiene las células simbióticas dentro de las cuales se alojan los simbiosomas que fijan nitrógeno. Todas las células simbióticas se encuentran en el mismo estado de desarrollo. B. Los nódulos indeterminados contienen varias zonas entre las que se puede distinguir un meristema apical (I), una zona de infección (II), una zona de fijación (III) y una zona de senescencia (IV). La diferenciación ocurre entre la zona II y III alcanzando su máxima diferenciación en la zona III. C. Imagen de un nódulo del tipo determinado producido por *S. fredii* en *Glycine Max*. D. Imagen de un nódulo del tipo indeterminado producido por *S. meliloti* en *Medicago sativa*.

Imágenes A y B adaptada de Kondorosi et al. (2013) – Imágenes C y D extraídas de Masson-Boivin et al. (2009)

Regulación de nodulación

El proceso de colonización, infección y nodulación antes descrito sería incompleto sin recalcar que no todos los rizobios que participan en el “diálogo molecular” llegan a formar nódulos. La formación del nódulo y la fijación de nitrógeno son procesos riesgosos y energéticamente costosos para la planta, la cual regula estrictamente el proceso de nodulación de acuerdo a sus necesidades y al ambiente en el que se encuentra (Gage, 2004).

El número de IT iniciados después de la inoculación de una leguminosa con un rizobio compatible, generalmente excede ampliamente el número de nódulos que se desarrollan (Vasse, et al., 1993). La disponibilidad de nitrato y amonio afectan negativamente la nodulación (Streeter & Wong, 1988). La planta utiliza varios mecanismos para controlar el número de nódulos:

- Las fitohormonas como el etileno y el ácido abscísico (ABA) regulan negativamente la nodulación, a través de la modificación de las respuestas generadas en la epidermis. El etileno tiene un importante rol en el control del número de nódulos. La aplicación de etileno exógeno afecta negativamente la nodulación a través de la inhibición de las respuestas tempranas. Inhibidores y antagonistas de la acción del etileno aumentan la formación de nódulos (Oldroyd, *et al.*, 2001). De manera similar, mutantes insensibles a la acción del etileno presentan un incontrolado progreso de IT, acompañado por un gran aumento en el número de nódulos (Penmetsa & Cook, 1997, Penmetsa, *et al.*, 2003). El ABA interfiere en la nodulación a dos niveles, tempranamente en la respuesta generada por los NF y el Ca^{2+} *spiking* y en la organogénesis del nódulo. El ácido jasmónico también ha sido relacionado con una regulación negativa de la nodulación aunque su rol no ha sido del todo dilucidado (Mortier, *et al.*, 2012).
- Además de los efectos locales producidos por las hormonas, se han identificado mecanismos a larga distancia que involucran el brote. Estos mecanismos sistémicos son principalmente activados por los primeros nódulos. Si bien el mecanismo molecular de esta regulación no ha sido identificado, se cree que pequeños péptidos específicamente expresados en el nódulo disparan la señal desde la raíz hacia el tallo y que la regulación de hormonas como JA, auxinas y brasinoesteroides, actúan desde el tallo hacia la raíz inhibiendo la formación de nódulos (Mortier, *et al.*, 2012).
- Mecanismos similares a los que se ponen en juego en las reacciones de hipersensibilidad (HR) capaces de limitar infecciones por medio de la secreción de ROS, acumulación de compuestos fenólicos y fitoalexinas, y la síntesis de proteínas asociadas a la defensa celular (glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, fenilalanina-amonioliasa, chalcona sintasa, y quitinasa) podrían estar relacionados al proceso de control de las infecciones de los rizobios por la planta. En general, las células que presentan este tipo de reacción han sido correlacionadas con el proceso de terminación temprana de los hilos de infección. Estos hilos abortados se pueden observar como formaciones helicoidales, en las que el hilo no dejó de crecer pero fue incapaz de atravesar la primera capa de células corticales del huésped (Vasse, *et al.*, 1993, Jones, *et al.*, 2007).

I.3. Abordajes metodológicos para el estudio de interacciones simbióticas y nichos de difícil acceso

El progreso en las tecnologías de secuenciamiento ha aumentado de manera exponencial la cantidad de genomas disponibles en la base de datos de secuencias. Sólo en el 2014 cerca de 10000 genomas de distintos organismos fueron puestos a disposición en diferentes bases de datos (<http://img.jgi.doe.gov/#IMGMission>). La gran cantidad de información genómica disponible ha llevado a importantes avances en el conocimiento de la diversidad bacteriana, estructura de operones, la caracterización de elementos móviles, y sobre todo, de los mecanismos de evolución bacteriana (Binnewies, *et al.*, 2006). El conocimiento de las secuencias genómicas de diferentes microorganismos ha permitido además el surgimiento de nuevas metodologías capaces de monitorear de forma global los niveles de ARN (transcriptómica) y proteína (proteómica), las cuales han sido aplicadas extensamente para la caracterización de la vida libre del rizobio y de ciertas etapas de simbiosis rizobio-leguminosa (Perret, *et al.*, 1999, Ampe, *et al.*, 2003, Chen, *et al.*, 2003, Djordjevic, *et al.*, 2003, Barnett, *et al.*, 2004, Becker, *et al.*, 2004, Davalos, *et al.*, 2004, Krol & Becker, 2004, Capela, *et al.*, 2006, Domínguez-Ferreras, *et al.*, 2006, Draghi, 2008, Karunakaran, *et al.*, 2009, Schlüter, *et al.*, 2010, Ramachandran, *et al.*, 2011, Schlüter, *et al.*, 2013, Torres-Quesada, *et al.*, 2014). Estos análisis globales de los transcritos y proteínas (denominados conjuntamente como “ómicas”) han permitido obtener una imagen global que refleja con buena precisión como los genes individuales cooperan para lograr cada “estado” fisiológico estudiado. Sin embargo, tienen la limitación de sólo poder ser aplicados en condiciones en las que sea posible obtener una cantidad suficiente de material homogéneo para poder acceder a una muestra de ARN representativa o, de igual manera, al perfil proteico. Antes de interactuar con la planta los rizobios se encuentran en un entorno complejo y dinámico como es la rizósfera y es posible pensar que cada uno de ellos tiene una identidad propia con la que afronta las necesidades y estreses en los que se ve involucrado. Esa capacidad de respuesta es la que determinará la capacidad de colonizar, adaptarse y crecer eficientemente la rizósfera, hechos que a su vez, determinarán qué rizobios interactuarán mejor con la planta, llegarán a adherirse a ella, formarán los hilos de infección, infectarán la planta y finalmente ocuparán los nódulos. Con este esquema en mente, la única posibilidad de conocer con un buen nivel de detalle lo que afronta el rizobio en su nicho natural es un seguimiento individual que permita observar los eventos, secuenciales y coordinados que ocurren a nivel de ARN.

Para abordar este complejo panorama y las limitaciones antes mencionadas, común al estudio de interacciones tanto simbióticas como patogénicas, se han desarrollado métodos que permiten la **identificación de marcadores que modifican su expresión *in vivo***, llamados IVET (del inglés: *In Vivo Expression Technology*) o, con ciertas modificaciones RIVET (del inglés: *Recombination-based In Vivo Expression Technology*).

I.3.1. Técnicas para análisis transcripcional *in vivo*: Sistemas trampa de promotores (IVET y RIVET)

Los primeros reportes de una técnica de trampa de promotores se remontan a un trabajo de Osbourn et al. en el cual se describe el diseño de un sistema para identificar genes de *Xanthomonas campestris* inducidos durante la infección de nabo (Osbourn, et al., 1987). En este trabajo se utilizó un plásmido de amplio rango de huésped, que contenía el gen *cat* (proveedor de resistencia a cloranfenicol) sin promotor, río arriba del cual se clonó una biblioteca genómica de *X. campestris*. De este modo, si una región con actividad promotora se encontraba clonada en el plásmido, se producía la transcripción del gen *cat*, y la bacteria adquiría resistencia a cloranfenicol. Al realizar esta experiencia en presencia de la planta, y utilizando cloranfenicol como presión de selección, sólo fueron capaces de crecer las bacterias que contenían una región promotora inducida durante la interacción planta-microorganismo.

Años más tarde, Mahan et al. (Mahan, et al., 1993) diseñaron un sistema IVET en el que a una cepa mutante de *Salmonella typhimurium* auxotrófica para el gen *purA* (requiere adenina para crecer) le introdujeron por recombinación simple una biblioteca genómica generada en un plásmido que provee fusiones transcripcionales a los genes *purA* y *lacZ* (gen reportero). La colección de recombinantes generada fue sometida a la condición de interés (se utilizaron en este caso ratones como modelo animal) y luego de un tiempo se recuperaron los clones sobrevivientes. Estos clones sobreviven solo si son capaces de sintetizar adenina, para lo cual la mutación en el gen *purA* debe complementarse. Esto ocurre sólo si una región con actividad promotora inducida dentro de los ratones transcribió el gen *purA*. Los clones sobrevivientes se recuperaron en medio suplementado con adenina, y se evaluaron en su actividad β -galactosidasa por repiques en medio de cultivo suplementado con X-gal. Los clones con actividad fueron asociados a regiones con actividad promotora constitutiva. Los clones de interés fueron seleccionados como aquellos que no mostraron actividad β -galactosidasa *in vitro*.

La tecnología de expresión *in vivo* basada en recombinación, RIVET (*Recombination-based In Vivo Expression Technology*) fue introducida por Camilli et al. (1994) como una variante mejorada de la metodología IVET (Camilli, et al., 1994). Esta variante se basa en la utilización de la resolvasa TnpR del transposón- $\gamma\delta$ (una recombinasa específica de sitio) y la secuencia blanco reconocida por la misma, llamados sitios *res*, para la generación de un sistema que permite la identificación de genes inducidos en una condición *in vivo* de interés. Para ello se vale de la capacidad de la resolvasa de producir la escisión de un *cassette* de selección, si el mismo se encuentra flanqueado por secuencias *res* en repetición directa (Figura I.6). Al igual que los métodos IVET descritos con anterioridad, los sistemas de este tipo pueden dividirse en dos módulos: a) un **módulo de trampa de promotores (Módulo A)** en el que se generan fusiones transcripcionales al gen *tnpR* de la resolvasa y al gen reportero *lacZ* (promotor-*tnpR-lacZ*), y b) un **sistema indicador (Módulo B)** constituido por un *cassette* de resistencia a tetraciclina (Tc) flanqueado por dos sitios *res* (blanco de la resolvasa) en repetición directa.

El funcionamiento de este sistema implica la integración en el genoma del microorganismo en estudio tanto del Módulo A (trampa de promotores) como del Módulo B. La colección de bacterias portadoras de la fusión transcripcional se utiliza a continuación para el desafío en la condición de interés. Si en esta condición la resolvasa (Módulo A) se expresa (por la actividad del promotor que se encuentra río arriba), el *cassette* de resistencia a tetraciclina (Módulo B) se escinde y como consecuencia la bacteria se vuelve sensible al antibiótico, característica que permite su selección (Figura I.6).

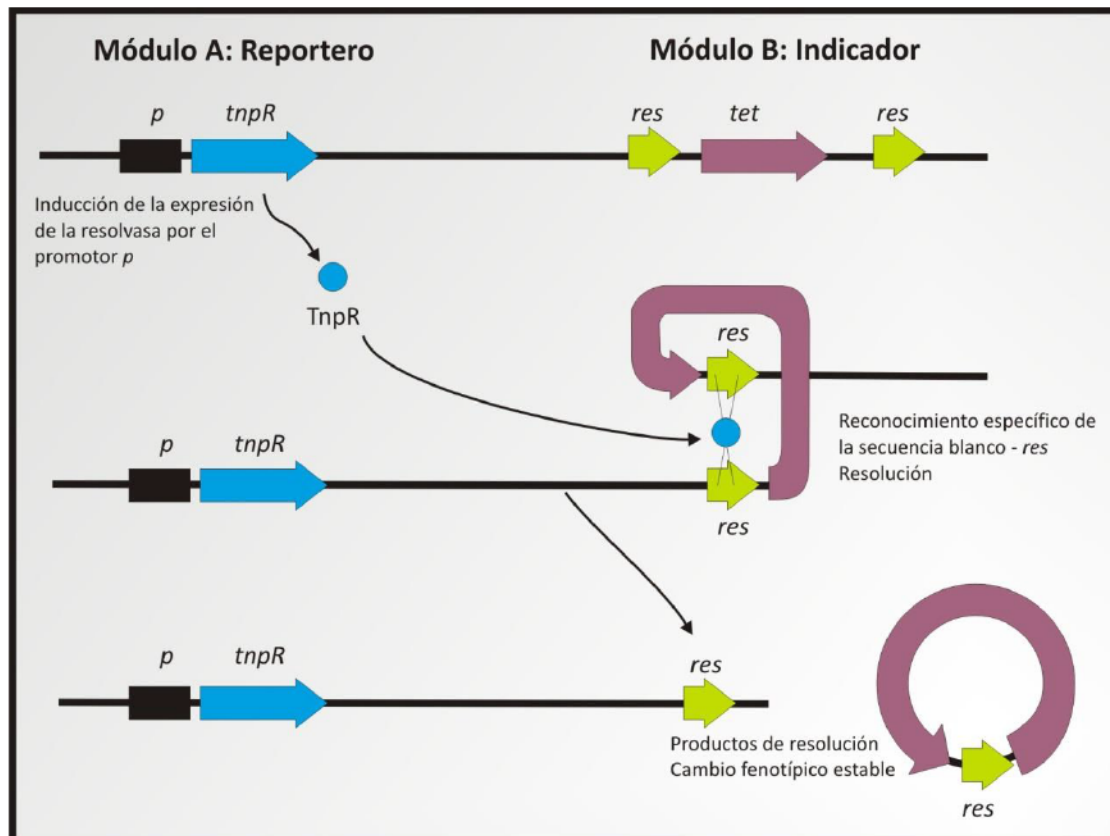


Figura I. 6. Esquema de funcionamiento del sistema de expresión in vivo, RIVET.

El sistema consta de dos módulos: Módulo A, trampa de promotores que consta del gen codificante de una recombinasa específica de sitio *tnpR* sin promotor, que se utiliza para generar las fusiones transcripcionales y por otro lado un Módulo B, indicador, que está compuesto por un *cassette* flanqueado por los sitios de reconocimiento de la TnpR, *res/res1*, en orientación directa. La expresión de la TnpR producto de la actividad promotora de la secuencia ubicada río arriba del gen, producirá la escisión del *cassette* indicador provocando un cambio fenotípico estable en la bacteria que lleva ambos módulos.

La utilización de los sistemas tipo RIVET para la identificación de genes específicamente inducidos en una condición de interés requiere una etapa de preselección, en la cual se seleccionan por resistencia a Tc todos aquellos clones que *in vitro* no expresen la resolvasa. En este procedimiento se descartan todos los clones en los que la región clonada posee actividad promotora constitutiva o una actividad basal suficiente para producir la escisión del *cassette* de selección. La colección resultante depende de las condiciones de selección utilizadas, y contiene todos los posibles conjuntos de genes que no se expresan *in vitro*. Posteriormente, este conjunto preseleccionado se

utiliza para inocular al huésped. Los clones cuyo promotor sea inducido en el huésped expresarán la resolvasa, y se transformarán en Tc sensibles. La etapa siguiente es la recuperación de las bacterias del huésped y la selección en medio de cultivo suplementado con X-gal. Los clones blancos (en los que el promotor que contienen no está inducido *in vitro*) se repican en cajas con y sin Tc, seleccionándose los clones sensibles a Tc, que son aquellos que *in vivo* han expresado la resolvasa.

Del sistema RIVET original diseñado por Camilli et al. (1994) se han generado variantes. Por ejemplo, Bron et al. utilizaron la recombinasa específica de sitio del fago P1 (gen *cre*) para generar las fusiones transcripcionales (Bron, et al., 2004). En este caso el *cassette* de selección es flanqueado por sitios *loxP*, blancos de la recombinasa Cre. Por otro lado, Camilli et al. (1994) utilizaron además una variante de la secuencia *res*, denominada *res1*, que posee una mutación de T por C en el sitio implicado en la recombinación (Stark, et al., 1991). La secuencia *res1* presenta una menor frecuencia de recombinación, lo que permite disminuir la muy alta sensibilidad del sistema, que podría causar la pérdida de clones que posean, en la trampa de promotores, una secuencia con actividad promotora basal baja pero inducible en la condición de estudio (Camilli, et al., 1994, Camilli & Mekalanos, 1995).

Osorio et al. implementaron una serie de mejoras al sistema RIVET original (Osorio, et al., 2005). Las mejoras incluyen: a. La generación de mutantes en el sitio de unión ribosomal (RBS) del gen de la resolvasa *tnpR*, con el objetivo de regular aún más la sensibilidad del sistema. Estos mutantes se ven afectados en la traducción de la resolvasa y requieren de una fuerte expresión de la misma para la escisión del *cassette* indicador y b. La generación de un sistema de selección positiva por medio de la utilización del gen *sacB* (Saviola, et al., 2003), codificante de la enzima levansucrasa de *Bacillus subtilis* (Selbitschka, et al., 1995). Esta enzima participa en la síntesis de levano (un polisacárido tóxico para bacterias Gram negativas y para algunas Gram positivas) a partir de sacarosa, convirtiendo a las cepas portadoras de este gen en sensibles al crecimiento en medios de cultivo suplementados con sacarosa. La introducción del gen *sacB* en el *cassette* escindible por acción de la resolvasa, permite que por efecto de la expresión de *tnpR* a partir de un promotor determinado, la cepa inicialmente sensible a sacarosa, se vuelva nuevamente capaz de crecer en medios suplementados con sacarosa.

Variantes construidas en nuestro laboratorio

En la última década en nuestro laboratorio, se ha trabajado en la generación de variantes tanto del módulo reportero como del módulo indicador para la identificación, mediante la metodología RIVET, de genes inducidos en las distintas etapas del proceso de asociación *S. meliloti* – alfalfa (Lozano, 2010, Lozano, et al., 2011, Lozano, et al., 2013a).

- Sistema indicador (Módulo B): Basados en el sistema desarrollado por Camilli et al. (1994), en nuestro laboratorio se ha diseñado un *cassette* indicador que permite la selección positiva de los clones de interés. En otras palabras, mediante la utilización de esta variante los clones que presentan actividad recombinasa generan simultáneamente la pérdida de una resistencia a antibiótico (Neomicina, Nm) y la ganancia de la resistencia a otro antibiótico (Gentamicina, Gm) y la expresión de GFP (Figura I.7)

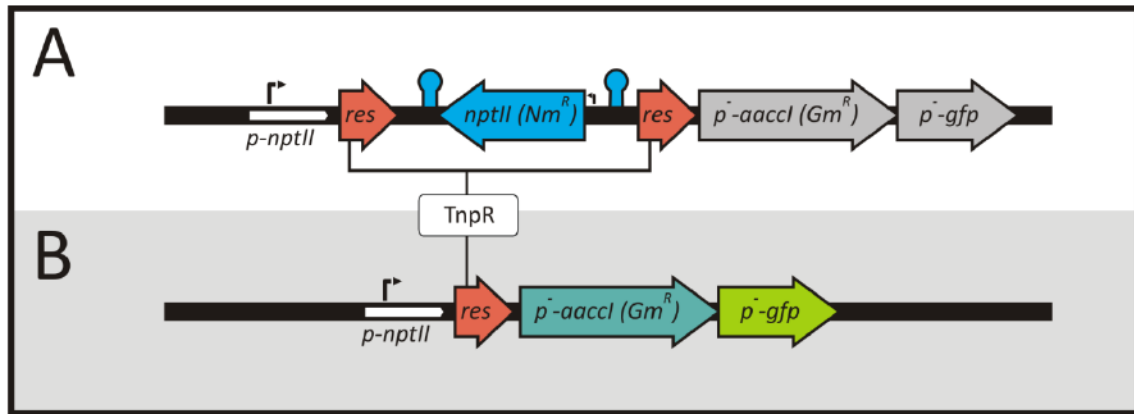


Figura I. 7 Sistema de selección positiva basado en ganancia / pérdida de cassettes de resistencia a antibióticos construido por Lozano et al. (2010)

A. Estructura del sistema de selección positiva RΩGG. *nptII*: cassette de resistencia a Nm / Km (neomicina fosfotransferasa). Posee codones stop, en todos los marcos de lectura, y una secuencia de terminación de transcripción. *accC1*: gen de resistencia a gentamicina (aminoglucósido acetiltransferasa), SIN promotor. *gfp*: gen de la proteína verde fluorescente (GFP) SIN promotor. *res*: sitios de reconocimiento de la resolvasa TnpR. $p\text{-nptII}$: promotor del gen *nptII*. B. Estructura del sistema de selección positiva RΩGG luego de la recombinação específica de sitio mediada por TnpR. La expresión de la TnpR genera la pérdida de la resistencia a neomicina, y simultáneamente la ganancia de la resistencia a gentamicina y la expresión de la GFP. Imagen tomada de Lozano et al (2013b).

- Sistema trampa de promotores (Módulo A): En nuestro laboratorio se han construido adicionalmente dos vectores para generar las fusiones transcripcionales al gen *tnpR*, llamados pRIVET-I (Integrativo) y pRIVET-R (Replicativo). En el plásmido pRIVET-I el gen *tnpR* sin promotor se encuentra situado inmediatamente río abajo de un sitio *BglII* único en el vector. Dicho sitio se utiliza para la generación de bibliotecas de fragmentos de ADN de modo que la misma represente de la mejor manera posible todas las regiones promotoras de la bacteria cuyo estudio quiere abordarse. En este caso, luego de la integración del vector por recombinação homóloga en el genoma de la bacteria que se desea estudiar (y de la que se preparará la biblioteca), la resolvasa quedará bajo el control transcripcional de la región genómica en la que se ha integrado el vector, aún en el caso de insertos chicos. La identificación de los genes inducidos *in vivo* requerirá finalmente la recuperación del vector con las secuencias genómicas asociadas a la región río arriba de la resolvasa, mediante clonados genómicos al final del estudio RIVET. La segunda alternativa, pRIVET-R, utiliza vectores trampa de promotores basados en plásmidos con la capacidad de replicar en la bacteria que se desea estudiar (vectores de amplio rango de huéspedes). La ventaja principal de estos sistemas es la fácil recuperación de los plásmidos de interés al final del estudio RIVET. Sin embargo el uso de vectores replicativos requiere bibliotecas con mayores coberturas que las bibliotecas integrativas, atento a que no todos los insertos incluirán promotores. En las bibliotecas integrativas todos los insertos orientados de manera adecuada servirán para detectar actividades promotoras.

Antecedentes del uso de herramientas trampa para el estudio de rizósferas y de la simbiosis S. meliloti- alfalfa

El primer estudio de IVET en rizobios fue realizado por Oke et al. (1999) (Oke & Long, 1999). En este trabajo los autores utilizaron una variante de la metodología IVET para identificar genes necesarios para la infección y diferenciación al estado de bacteroides durante la simbiosis *S. meliloti* alfalfa. Para lograrlo se construyó un sistema de trampa de promotores en el cual los genes inducidos *in vivo* producen la expresión del gen *bacA*, requerido para la diferenciación a bacteroides. Este sistema les permitió la selección de 230 fusiones inducidas *in planta*. Una estrategia similar fue utilizada por Zhang et al. (2006) para encontrar genes inducidos más tempranamente en la simbiosis. En este caso la complementación *in vivo* se realizó con el gen *exoY* (Zhang & Cheng, 2006). También se han utilizado métodos basados en IVET para el estudio de genes inducidos por *R. leguminosarum* en la rizósfera de arveja. En este trabajo los autores identificaron 29 genes inducidos específicamente en rizósfera (Barr, et al., 2008).

La variante RIVET también ha sido utilizada para el estudio de la simbiosis rizobio-leguminosa. Gao y Teplitski (2008) utilizaron el sistema para estudiar la regulación y cuantificar la expresión *in vivo* de genes de *S. meliloti* cuya función en simbiosis era previamente conocida (Gao & Teplitski, 2008). Harrison et al. 2011 introdujeron mejoras que se basaron en la utilización de la recombinasa Cre, y un *cassette* de selección positiva potencialmente aplicable en *S. meliloti*, sin embargo en este reporte no utilizaron el sistema para el desafío de ninguna condición biológica (Harrison, et al., 2011).

Ventajas y desventajas de los sistemas de trampa de promotores

Una de las ventajas importantes de las metodologías IVET/RIVET es la capacidad de identificar genes que se expresan débilmente. El sistema exige, sin embargo, que los genes buscados por expresarse diferencialmente de modo positivo dentro del hospedador, no se expresen (o lo hagan a un nivel extremadamente bajo) en la condición control. Particularmente la metodología RIVET tiene la capacidad de coleccionar al final del ensayo todos aquellos promotores que fueron inducidos a lo largo del desafío (“memoria acumulativa”). Esta capacidad se debe a que una vez inducida la expresión de la resolvasa, el *cassette* flanqueado por los sitios *res* es escindido, y la cepa cambia su patrón de resistencia a antibióticos de forma permanente (Figura 1.7). Esta representa la principal ventaja respecto de los métodos IVET dado que permite la identificación de genes que se expresan durante breves intervalos de tiempo dentro del huésped. Si bien no es una limitación en nuestro sistema de estudio, otra particularidad de estas técnicas es su aplicabilidad en bacterias cuyo genoma no ha sido completamente secuenciado. Por otro lado, los análisis transcriptómicos (del tipo IVET, RIVET, arrays, RNA-seq) permiten conocer el conjunto de genes transcripcionalmente activos en instancias específicas pero siempre deben ser acompañados de aproximaciones experimentales que permitan establecer, desde un análisis funcional, la relevancia real de los diferentes transcritos en la condición de interés. En este sentido, **existen otro conjunto de aproximaciones orientadas a la detección de genes que, independientemente de su patrón de expresión, son esenciales para**

mantener un fenotipo salvaje. Describiremos a continuación las estrategias metodológicas que permiten este último abordaje (funcional).

I.3.2. Aproximaciones funcionales para el estudio de interacciones microorganismo-huésped

El creciente avance en la disponibilidad de información ha creado (o aumentado) una brecha entre el rápido progreso de información genómica y el lento progreso de la caracterización funcional de los genomas secuenciados (Galperin & Koonin, 2010). Van Opijnen y Camilli comentan en una revisión reciente, que si hoy se procediera a secuenciar el genoma de un microorganismo desconocido, el porcentaje de genes sin función asociada sería aproximadamente el mismo que el obtenido una década atrás (entre un 30-40%) (van Opijnen & Camilli, 2013). La manera más antigua pero todavía hoy más utilizada de conocer el rol biológico de un gen sigue siendo la construcción de mutantes y el posterior análisis fenotípico de los mismos. Sin embargo, para el estudio de interacciones microorganismo-huésped este desafío individual resulta inabarcable cuando lo que se quiere estudiar es un gran número de genes. Una alternativa para facilitar el estudio de mutantes fue propuesta por Hensel et al. (1995) (Hensel, Shea et al. 1995). En este trabajo los autores realizan mezclas de mutantes por transposición de *Salmonella typhimurium* dentro de la cual cada mutante se encuentra identificado por una firma distinta dentro del transposón. Esta mezcla de bacterias portadoras de transposones en distintos lugares del genoma (y a su vez, asociados a distintas firmas) son desafiadas a un modelo animal. Después del desafío los autores comparan la mezcla de mutantes obtenidos (mezcla de salida) con la mezcla inicial (entrada) y evalúan como cambió la proporción de firmas. Las firmas que se asocian a una variación negativa en el desafío se corresponden con mutantes que se encontraron afectados en esa condición (Figura I.8). A esta técnica se la llamo mutagénesis etiquetada por firmas o **Signature-Tagged-Mutagenesis (STM)** y ha sido aplicada al estudio de genes de relevancia de una gran cantidad de bacterias, tanto en vida libre como en asociación con su huésped (incluyendo *Vibrio Cholerae* (Chiang & Mekalanos, 1998), *Staphylococcus aureus* (Schwan, et al., 1998), *Streptococcus agalactiae* (Jones, et al., 2000), *Streptococcus pneumoniae* (Hava & Camilli, 2002), *Helicobacter pylori* (Kavermann, et al., 2003), *Mycobacterium tuberculosis* (Camacho, et al., 1999), *Sinorhizobium meliloti* (Pobigaylo, 2006), *Mesorhizobium loti* (Borjigin, et al., 2011), *Burkholderia multivorans* (Nagata, et al., 2014)).

Como puede observarse en la figura I.8, las etapas de estrategia experimental para la identificación por STM de genes vinculados a la expresión de un fenotipo dado puede resumirse en los siguientes pasos: a) La generación de mezclas de mutantes etiquetados que representará la **mezcla de entrada**, b) El desafío de dicha mezcla en la condición de interés (**etapa de selección**) y c) la evaluación del cambio en la proporción de cada firma en la **mezcla de salida**, respecto a la cantidad inicial en la mezcla de entrada. Para la generación de mutantes etiquetados, el método más ampliamente utilizado es la transposición *in vivo* con transposones etiquetados con diferentes secuencias cortas (en general entre 20 y 40 pb) (Hensel, et al., 1995, Leigh, et al., 2005, Pobigaylo, 2006, Pobigaylo, et al., 2006), aunque también se ha reportado la utilización de mutagénesis *in vitro* (Hava & Camilli, 2002, Kavermann, et al., 2003). Debido a que el número de transposones diferentes es limitado, ese mismo conjunto de transposones variables es el que se utiliza para generar varias

mezclas de mutantes (*pools*) y así ampliar la cobertura de la biblioteca (en la figura I.8, hasta *pool n*). Una vez realizado el desafío debe evaluarse cómo cambió la abundancia relativa de firmas en la mezcla de salida, respecto a la muestra de entrada. Con este fin, la mayor parte de los trabajos han publicado la utilización de hibridaciones en microarreglos de los productos de amplificación de las firmas (amplificados con cebadores comunes que flanquean las firmas) (Karlyshev, *et al.*, 2001, Groh, *et al.*, 2005, Pobigaylo, *et al.*, 2006). Otros trabajos reportaron la amplificación específica de cada uno de los sitios variables, de esta manera la presencia de cada firma puede seguirse por qPCR o PCR y una posterior corrida electroforética de los productos (Lehoux & Levesque, 2002, Shimoda, *et al.*, 2008).

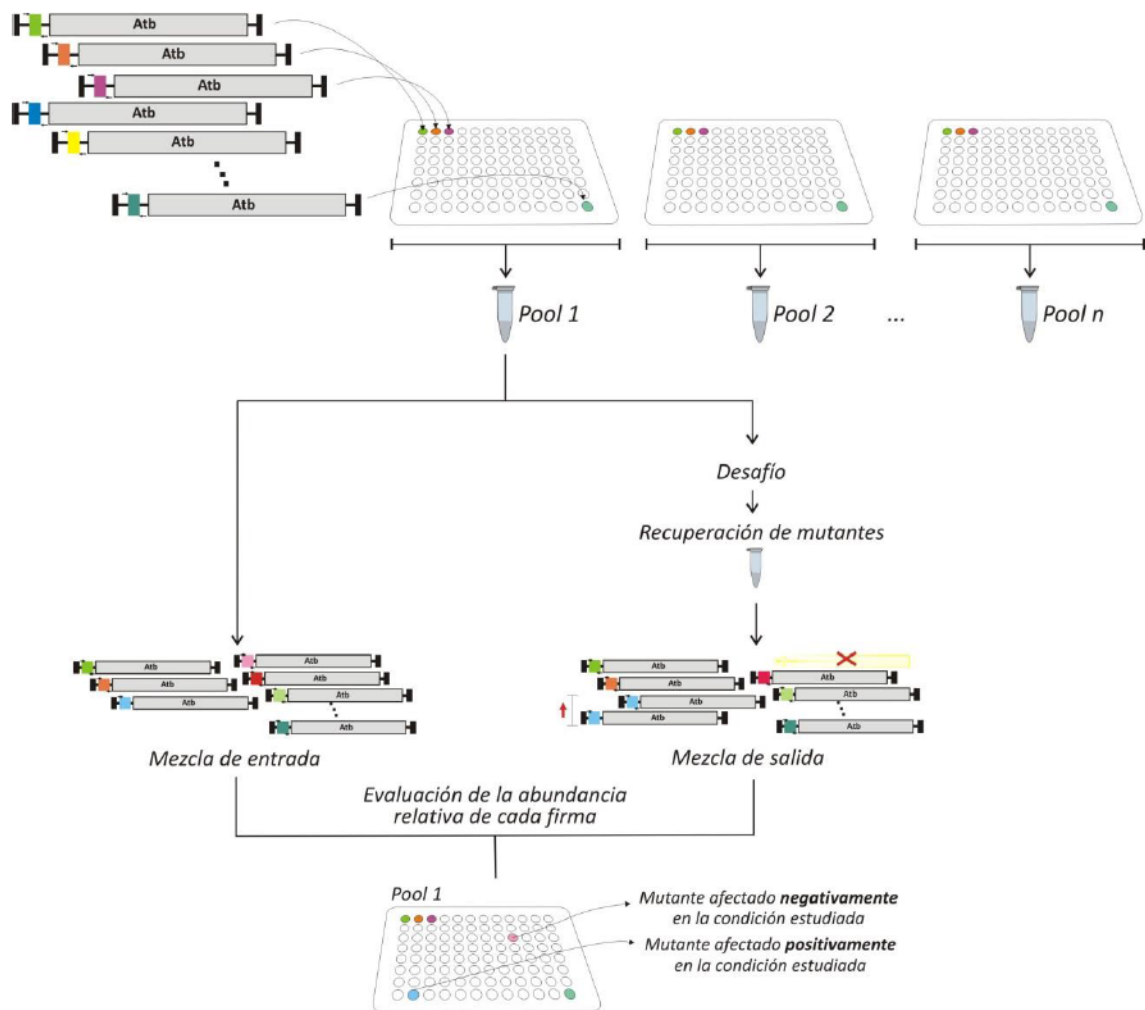


Figura I. 8. Mutagénesis etiquetada por firmas (STM). Esquema y concepto.

A partir de transposones con firmas variables se generan mezclas de mutantes (*pools*), que son desafiados a la condición de interés. Después del desafío los mutantes son recuperados y la proporción de cada firma es evaluada en la mezcla inicial (entrada) y en la mezcla de salida. La comparación de la cantidad relativa de cada firma en ambas mezclas permite identificar mutantes que durante el desafío disminuyeron (afectados negativamente) o aumentaron (afectados positivamente) su representatividad. Como la composición de la mezcla inicial es definida y conocida los mutantes que resultan de interés, pueden posteriormente ser utilizados en experimentos individuales.

Secuenciación directa de sitios de inserción (TraDIS y Tn-Seq)

Recientemente, las plataformas de secuenciamiento de alta penetración han permitido el reemplazo de los métodos que utilizan transposones etiquetados e hibridaciones por métodos de secuenciación directa de los sitios de inserción, llamados TraDIS (del inglés *Transposon-Directed Insertion Site Sequencing*) (Figura I.9) o Tn-Seq (Gawronski, *et al.*, 2009, Goodman, *et al.*, 2009, Langridge, *et al.*, 2009, van Opijnen, *et al.*, 2009). Todos estos métodos se basan en el mismo principio que STM, sin embargo, en lugar de requerir firmas diferentes para identificar los mutantes, lo que se utiliza como firma es la propia secuencia flanqueante a cada transposón. Las muestras de

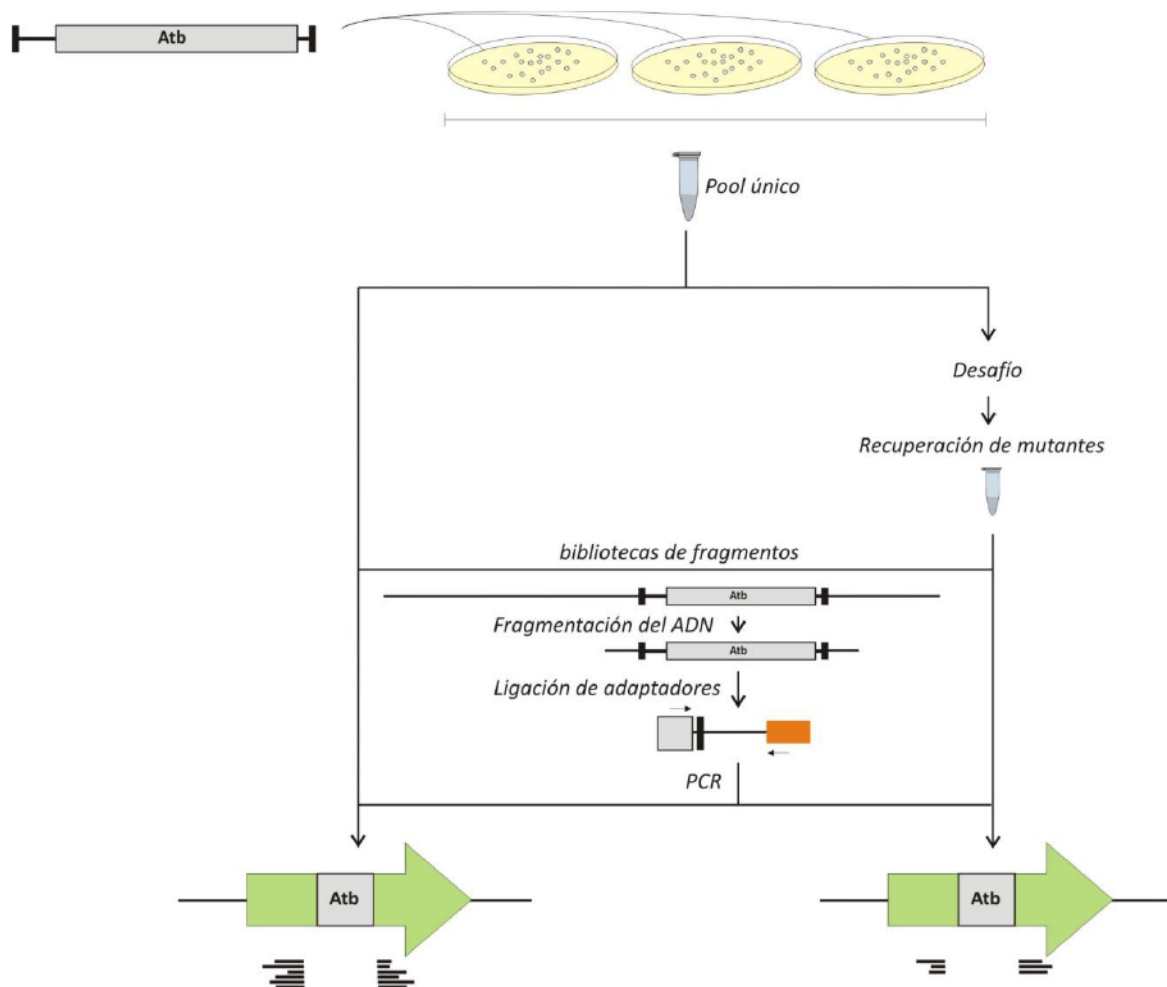


Figura I. 9. Secuenciación directa de los sitios de inserción (TraDIS).

Un único transposón es utilizado para la generación de una mezcla de mutantes, que es desafiada en la condición de interés. Posteriormente, a partir del ADN extraído de la mezcla de entrada y salida (independientemente) se producen bibliotecas de fragmentos que son posteriormente ligados a adaptadores. La secuencia del transposón y la de los adaptadores son utilizadas como sitios de hibridación de cebadores utilizados para la amplificación específica de los fragmentos flanqueantes al transposón. Los productos de amplificación son secuenciados masivamente y mapeados. La cantidad relativa de lecturas obtenidas en cada mezcla permite conocer con precisión que inserciones derivaron en efectos negativos/ positivos a lo largo del desafío.

ADN obtenidas a partir de la mezcla de entrada y de la mezcla de salida son (independientemente) fragmentadas y ligadas a adaptadores para facilitar la amplificación de los fragmentos generados. Los productos de amplificación son posteriormente secuenciados masivamente lo que permite cuantificar e identificar las inserciones que derivaron en efectos negativos/positivos/nulos en esa condición. Las ventajas que estas variantes presentan son principalmente tres: a. No requieren la generación de familias de transposones con firmas variables, b. El desafío de todos los mutantes es simultáneo (no por *pooles*) y c. No se requieren de hibridaciones para la evaluación de la abundancia relativa de cada firma en la mezcla inicial y final. Sin embargo, es importante mencionar que en experimentos de interacciones microorganismo-hospedador deberá controlarse la complejidad de la muestra inicial (entrada) teniendo en cuenta las limitaciones del sistema (el desafío de mezclas muy numerosas requerirá inóculos de alto título en donde todos los mutantes se encuentren representados) y, de igual manera, la mezcla de salida deberá necesariamente estar conformada por una cantidad representativa de mutantes. Una importante desventaja de estos métodos es que una vez identificadas las mutaciones que derivan en efectos de interés, los mutantes identificados no se encuentran disponibles para posteriores experimentos porque la composición de la mezcla inicial es desconocida.

Antecedentes del uso de herramientas trampa para el estudio de la simbiosis rizobio-leguminosa

El primer trabajo que reportó el uso de STM para el estudio de interacciones rizobio-leguminosa fue realizado por Pobigaylo et al. (2006), orientado a la caracterización de genes de relevancia de *S. meliloti*. Para este estudio se construyeron 412 mini-Tn5 portadores de dos firmas variables de 24 pb. El uso de doble firma aumenta la especificidad de la detección. Con este set de transposones se construyeron 30 mezclas de mutantes (un total de alrededor de 12000) (Pobigaylo, et al., 2006). Dos mezclas de 378 mutantes fueron utilizadas para experimentos de competición por la ocupación de nódulos en *Medicago sativa* (Pobigaylo, et al., 2008). Este desafío permitió la identificación de 67 mutantes con fenotipo afectado incluyendo genes *exo*, *fix* y *nif* cuyo rol en simbiosis ya había sido reportado previamente (Long, 2001, Pobigaylo, et al., 2008). Más recientemente se reportó la construcción de una biblioteca STM de cerca de 30000 mutantes independientes en *Mesorhizobium loti* (Shimoda, et al., 2008). Alrededor de 2000 mutantes de esta biblioteca fueron utilizados para la búsqueda de genes de relevancia en simbiosis en la interacción *M. loti* – *Lotus japonicus* lo que permitió la identificación de 69 mutantes afectados negativamente en la competición por la nodulación (Borjigin, et al., 2011).

Objetivos

Consideraciones generales

Los rizobios y leguminosas se asocian a través de un complejo proceso de interacción en el que la percepción recíproca a lo largo del camino simbiótico, sirve de señal de diferenciación para inducir cambios bioquímicos y morfológicos de ambos participantes, que finalizan en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de las plantas. En ese proceso, el número de nódulos finales está cuidadosamente regulado para evitar infecciones innecesarias que son energéticamente costosas para la planta. Así, dado que el nicho simbiótico está naturalmente limitado, acceden al mismo aquellas cepas del suelo que muestran las mejores cualidades en términos de capacidad asociativa (mayor competitividad simbiótica).

La inoculación de suelos con cepas seleccionadas por poseer máxima capacidad de fijación de nitrógeno ha resultado muchas veces poco eficiente. El principal impedimento para que estos rizobios seleccionados sean buenos inoculantes, ha sido su pobre capacidad de competir con los rizobios nativos por un nicho en la planta. Las evidencias indican que los fenómenos asociados a los primeros estadios de interacción, son determinantes para definir la proporción de cada una de las cepas que ocupará el espacio simbiótico. En este contexto, se torna entonces importante conocer en detalle las etapas y mecanismos que median la interacción durante el diálogo temprano entre planta y bacteria. El acceso a dicho conocimiento permitirá conocer mecanismos básicos de interacción entre microorganismos y hospedadores vegetales, analizar su grado de ubicuidad, y eventualmente trabajar en la estimulación de aquellos que favorecen la competitividad temprana (y por la ocupación final de nódulos).

La identificación de marcadores genéticos asociados a la simbiosis temprana es difícil de abordar prácticamente con tecnologías ómicas, principalmente debido a restricciones metodológicas derivadas de los bajos números de rizobios inoculados, y de las limitaciones que surgen de implementar -bajo esas condiciones- análisis masivos de expresión y caracterización fenotípica.

Con el propósito de soslayar los inconvenientes metodológicos anteriores y caracterizar de modo más acabado el diálogo temprano durante la simbiosis entre *Medicago sativa* y *S. meliloti*, abordamos los objetivos que se describen a continuación.

Objetivo general

Búsqueda y selección de determinantes genéticos de *Sinorhizobium meliloti* asociados a la colonización temprana de la rizósfera y del rizopiano de su planta huésped *Medicago sativa* (alfalfa).

Objetivos específicos

1. Diseño de herramientas para el estudio de la simbiosis temprana:

- a. Construcción y validación de nuevas herramientas para la búsqueda de genes inducidos durante la simbiosis inicial. Desarrollo y evaluación de sistemas RIVET transposicionales. Evaluación de potencialidades y limitaciones.
- b. Diseño de nuevas aproximaciones experimentales para la selección fenotípica de mutantes alterados en la colonización radicular temprana: Uso de transposones etiquetados con firmas (STM) y secuenciamiento de alta capacidad. Evaluación de potencialidades y limitaciones.

2. Búsqueda de genes/regiones génicas asociados/as a la colonización rizosférica temprana de raíces de alfalfa por *S. meliloti*. Búsqueda de marcadores genéticos de *S. meliloti* asociados preferencialmente a la colonización de raíces de su planta hospedadora alfalfa.

3. Validación fenotípica de los mutantes seleccionados por STM: evaluación de su comportamiento simbiótico frente al rizobio salvaje. Construcción de un modelo consolidado de colonización rizosférica.

4. Construcción de un modelo de colonización de raíces por rizobios ajustado a las evidencias genéticas y fisiológicas colectadas.

Capítulo



Materiales y Métodos

II. 1. Procedimientos Microbiológicos

II.1.1. Cultivos bacterianos

Condiciones de crecimiento

Para el crecimiento de cepas de *Escherichia coli* se utilizó el medio de cultivo LB (Bertani, 1951), de la siguiente composición:

Medio LB

Glucosa 1g/l
NaCl 5g/l
Tryptona 10g/l
Extracto de levadura 5g/l
Agar 15g/l (sólo para medio sólido)

Los cultivos se incubaron por el tiempo requerido a 37 °C con agitación (180 rpm). La estimación del número de bacterias se realizó por medición fotométrica de la densidad óptica a 600 nm (una $DO_{600} = 0.1$ corresponde a aproximadamente a 2×10^7 UFC/ml), o por recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) tras el plaqueo de diluciones seriadas de los cultivos a determinar.

Para el caso de *Sinorhizobium meliloti*, los cultivos se incubaron a 28 °C con agitación (180 rpm). Para el crecimiento se utilizó medio rico TY (Beringer, 1974) de la siguiente composición:

Medio TY

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,9 g/l
Tryptona 5 g/l
Extracto de levadura 3 g/l
Agar 15g/l (sólo para medio sólido)

La estimación del número de bacterias se realizó por mediciones de DO_{600} (utilizando la relación de que una $DO_{600} = 0.1$ corresponde a aproximadamente 1×10^8 UFC/ml). En todos los casos, el material a utilizar se esterilizó durante 20 minutos a 120 °C en autoclave.

Curvas de crecimiento

Para evaluar el comportamiento de mutantes en condiciones nutricionales mínimas se utilizó medio Evans pH 7 (Evans, *et al.*, 1970) cuya composición se encuentra detallada en la tabla II.1.

Las curvas de crecimiento fueron realizadas en los medios indicados en pocillos de placas *multiwell*, a partir de diluciones 1:100 de cultivos previamente crecidos en medio rico. Para la incubación y medición se utilizó un lector de microplacas multifuncional marca BMG Labtech. Las lecturas de DO_{600} se realizaron cada 30 minutos.

Tabla II. 1. Composición del medio de cultivo Evans. (Evans, *et al.*, 1970)

Medio Mínimo Evans pH=7																																															
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Composición</th> <th>g/l</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Glucosa</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>PO₄H₂Na anhidro</td> <td>0,6</td> </tr> <tr> <td>ClNH₄</td> <td>0,7</td> </tr> <tr> <td>KCl</td> <td>0,3725</td> </tr> <tr> <td>Na₂SO₄</td> <td>0,142</td> </tr> <tr> <td>Ac. Cítrico</td> <td>0,21</td> </tr> <tr> <td>Cl₂Mg.6H₂O</td> <td>0,127</td> </tr> <tr> <td>Solución Micronutrientes</td> <td>5ml</td> </tr> <tr> <td>Solución Calcio</td> <td>1ml</td> </tr> <tr> <td>Solución Vitaminas</td> <td>1ml</td> </tr> <tr> <td>PIPES (pKa: 6.8) 20 mM</td> <td>6.048 g/l</td> </tr> </tbody> </table>		Composición	g/l	Glucosa	10	PO ₄ H ₂ Na anhidro	0,6	ClNH ₄	0,7	KCl	0,3725	Na ₂ SO ₄	0,142	Ac. Cítrico	0,21	Cl ₂ Mg.6H ₂ O	0,127	Solución Micronutrientes	5ml	Solución Calcio	1ml	Solución Vitaminas	1ml	PIPES (pKa: 6.8) 20 mM	6.048 g/l	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Soluciones Micronutrientes (5ml/l) 200X</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>FeCl₃.6H₂O</td> <td>5.4 g</td> </tr> <tr> <td>MnCl₂.4H₂O</td> <td>2 g</td> </tr> <tr> <td>ZnO</td> <td>0.412 g</td> </tr> <tr> <td>CuSO₄.5H₂O</td> <td>0.219 g</td> </tr> <tr> <td>CoCl₂.6H₂O</td> <td>0.452 g</td> </tr> <tr> <td>H₃BO₃</td> <td>64 mg</td> </tr> <tr> <td>Na₂MoO₄.2H₂O</td> <td>4 mg</td> </tr> <tr> <td>HCl</td> <td>8 ml</td> </tr> <tr> <td>H₂O</td> <td>hasta 1000 ml</td> </tr> </tbody> </table>		Soluciones Micronutrientes (5ml/l) 200X		FeCl ₃ .6H ₂ O	5.4 g	MnCl ₂ .4H ₂ O	2 g	ZnO	0.412 g	CuSO ₄ .5H ₂ O	0.219 g	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.452 g	H ₃ BO ₃	64 mg	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4 mg	HCl	8 ml	H ₂ O	hasta 1000 ml
Composición	g/l																																														
Glucosa	10																																														
PO ₄ H ₂ Na anhidro	0,6																																														
ClNH ₄	0,7																																														
KCl	0,3725																																														
Na ₂ SO ₄	0,142																																														
Ac. Cítrico	0,21																																														
Cl ₂ Mg.6H ₂ O	0,127																																														
Solución Micronutrientes	5ml																																														
Solución Calcio	1ml																																														
Solución Vitaminas	1ml																																														
PIPES (pKa: 6.8) 20 mM	6.048 g/l																																														
Soluciones Micronutrientes (5ml/l) 200X																																															
FeCl ₃ .6H ₂ O	5.4 g																																														
MnCl ₂ .4H ₂ O	2 g																																														
ZnO	0.412 g																																														
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.219 g																																														
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.452 g																																														
H ₃ BO ₃	64 mg																																														
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	4 mg																																														
HCl	8 ml																																														
H ₂ O	hasta 1000 ml																																														
		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Solución Ca⁺² 1000 X</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CaCl₂.2H₂O</td> <td>294 g</td> </tr> <tr> <td>H₂O</td> <td>1000 ml</td> </tr> </tbody> </table>		Solución Ca ⁺² 1000 X		CaCl ₂ .2H ₂ O	294 g	H ₂ O	1000 ml																																						
Solución Ca ⁺² 1000 X																																															
CaCl ₂ .2H ₂ O	294 g																																														
H ₂ O	1000 ml																																														
		<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">Solución Vitaminas 1000X</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>FeSO₄.7H₂O</td> <td>274 mg</td> </tr> <tr> <td>Riboflavina</td> <td>20 mg</td> </tr> <tr> <td>Ac. p-aminobenzoico</td> <td>20 mg</td> </tr> <tr> <td>Piridoxina-HCl</td> <td>20 mg</td> </tr> <tr> <td>Tiamina-HCl</td> <td>20 mg</td> </tr> <tr> <td>Biotina</td> <td>20 mg</td> </tr> <tr> <td>H₂O</td> <td>1000 ml</td> </tr> <tr> <td colspan="2">Esterilización por filtración</td> </tr> </tbody> </table>		Solución Vitaminas 1000X		FeSO ₄ .7H ₂ O	274 mg	Riboflavina	20 mg	Ac. p-aminobenzoico	20 mg	Piridoxina-HCl	20 mg	Tiamina-HCl	20 mg	Biotina	20 mg	H ₂ O	1000 ml	Esterilización por filtración																											
Solución Vitaminas 1000X																																															
FeSO ₄ .7H ₂ O	274 mg																																														
Riboflavina	20 mg																																														
Ac. p-aminobenzoico	20 mg																																														
Piridoxina-HCl	20 mg																																														
Tiamina-HCl	20 mg																																														
Biotina	20 mg																																														
H ₂ O	1000 ml																																														
Esterilización por filtración																																															

Antibióticos

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de una solución madre (*stock*) concentrada con respecto a la concentración final de uso. Las soluciones se prepararon en agua y se esterizaron por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro. La concentración de las soluciones stocks así como la concentración de antibióticos utilizada, tanto para *E. coli* como para *S. meliloti* se resumen en la tabla II.2.

Tabla II. 2. Antibióticos. Soluciones stock y concentraciones utilizadas en cultivos de *E. coli* y *S. meliloti*

Antibiótico	Solución Stock	<i>E. coli</i>	<i>S. meliloti</i>
Kanamicina (Km)	50mg/ml	50ug/ml	150ug/ml
Ampicilina (Ap)	200mg/ml	200ug/ml	-
Tetraciclina (Tc)	1mg/ml	10ug/ml	5ug/ml
Estreptomocina (Sm)	400mg/ml	100ug/ml	400ug/ml
Neomicina (Nm)	120mg/ml	-	120ug/ml
Gentamicina (Gm)	50mg/ml	10ug/ml	50ug/ml
Ac. Nalidíxico (Nal)	20mg/ml	10ug/ml	10ug/ml

Medios de conservación

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelación rápida de cultivos crecidos hasta fase logarítmica tardía suplementados con glicerol estéril a concentraciones finales del 20% (V/V) o 50% (V/V), según su almacenamiento se realizara a -20 °C o a -80 °C respectivamente.

II.1.2. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en esta tesis se describen la Tabla II.3. El total de todos los mutantes utilizados para los ensayos STM, componentes de las mezclas desafiadas, asociados a los sitios de inserción conocidos, se encuentra disponible en la base de datos del laboratorio de la Dra. Becker y puede ser consultada en el siguiente sitio de internet:

http://synmikro.com/images/agbecker/primer/mapped_mTn5-STM_Rm2011_mutants.txt

Tabla II. 3. Cepas y plásmidos utilizados en esta tesis

Cepas	Descripción	Fuente
<i>E. coli</i> Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galk16 rpsL(StrR) endA1 λ-</i>	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH5α	<i>recA, v1acU169, F80dlacZDM15</i>	Bethesda Res. Lab.
<i>E. coli</i> S 17-1	<i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc: :Mu-Km: :Tn7	Simon 1983
<i>E. coli</i> DH5α-λ- <i>pir</i>	<i>F- φ80dlacZAM15 A(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17 supE44 λ- thi-1 gyrA96 relAI-λpir</i>	Osorio, Crawford et al. 2005
<i>E. coli</i> SM10-λ- <i>pir</i>	<i>thi recA thr leu tonA lacY supE RP4-2-Tc::Mu λ::pir Km^R</i>	Osorio, Crawford et al. 2005
<i>E. coli</i> HB101	<i>supE44, hsdS20(r_B⁻ m_B⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galk2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, leuB6, thi-1</i>	Boyer and Roulland-Dussoix 1969
<i>B. tropica</i> Mto293	Nal ^R	Reis, Santos et al. 2004
<i>S. meliloti</i> 2011	Sm ^R , Nod ⁺ Fix ⁺ en alfalfa, derivada de la cepa SU47	J. Dénarié., France
<i>S. meliloti</i> 2011 R1ΩTGG	Cepa derivada de <i>S. meliloti</i> 2011: Sm ^R , Tc ^R , Gm ^S , GFP-P64L/S65T. Portadora del <i>cassette</i> de selección positiva.	Lozano, Salas et al. 2013a
<i>S. meliloti</i> 2011 MP6	Cepa 2011 conteniendo la proteína <i>gfp</i> bajo el control del promotor <i>pnptII</i> en región <i>recA-alaS</i>	Pistorio, Balagué et al. 2002
Plásmidos	Descripción	Fuente
pBAM1	Figura III.1	Martínez-García, Calles et al. 2011
pRIVETminiTn5-tnpR-lacZ	Figura III.1	Este trabajo. Lozano, Salas et al. 2013a
pRIVETmTn5-tnpR-lacZ-oriV	Figura III.1	Este trabajo. Lozano, Salas et al. 2013a
pG18-STM	Plásmido que contiene miniTn5 - Mapa del miniTn5. Fig IV.3.	Pobigaylo, Wetter et al. 2006

II.1.3. Transferencia de ADN

La incorporación de moléculas de ADN foráneo en células de *E. coli* se realizó por electrotransformación (electroporación). La transferencia de ADN entre *E. coli* y *S. meliloti* se realizó por conjugación. La transferencia de material entre dos cepas de *S. meliloti* se realizó por transducción. Los protocolos utilizados para cada uno de los casos se encuentran a continuación:

Transformación - Electroporación

La preparación de células de *E. coli* electrocompetentes se llevó a cabo por la técnica de Tung y Chow (Lin Tung & Chow, 1995). Se inocularon 100 ml de medio LB con 1 ml de un cultivo saturado durante 24 horas a 37 °C y con vigorosa agitación. Cuando la DO_{600} del cultivo llegó a un valor cercano a 0.6 el cultivo se enfrió en hielo durante 15 min. De aquí en adelante todo el procedimiento se realizó en frío. Las células se centrifugaron a 4.000xg por 15 min a 4 °C y se lavaron 2 veces con 200 ml de glicerol 10%. Finalmente, las células se resuspendieron suavemente en 0,5 ml de 10% glicerol en agua bi-distilada y se fraccionaron en alícuotas de a 100 μ l.

La electrotransformación fue llevada a cabo usando un equipo Gene Pulser (BioRad) en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por los fabricantes (25 μ F, 200 Ω , 2,5 kV). Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente 1 ml de medio LB y se incubó por 1 hora a 37 °C para permitir la expresión de fenotipos de resistencia a antibióticos que se hayan incorporado en la transformación. Finalmente las células se plaquearon en medio LB selectivo y se incubaron por 1 noche a 37 °C.

Conjugación

Las conjugaciones fueron realizadas según Simon et al. (Simon, 1983). El procedimiento experimental utilizado fue el siguiente: a 0,7 ml de un cultivo de la cepa donadora, en general cepas de *E. coli* S17-1 (o *E. coli* SM10- λ -pir; poseen las funciones de ayuda requeridas por plásmidos movilizables integradas en el cromosoma) portadoras del plásmido a transferir, de DO_{600} nm= 0.4 - 0,5 se le agregaron 0,7 ml de un cultivo de igual densidad óptica de la cepa aceptora, en nuestro caso la cepa *S. meliloti* 2011, o alguna cepa derivada de la misma. La mezcla se centrifugó a 2400 rpm por 8 minutos y el pellet se resuspendió suavemente en aproximadamente 50 μ l de medio TY líquido. Una gota de la suspensión bacteriana se colocó en una caja con medio TY sólido. La incubación se realizó a 28 °C durante toda la noche. La totalidad del crecimiento bacteriano fue resuspendido en medio TY líquido y plaqueado en medio TY suplementado con los antibióticos adecuados. En todos los casos se incluyeron controles con la cepa donadora y la cepa receptora procesadas por separado.

Cuando se requirió determinar la frecuencia de conjugación, se realizaron diluciones seriadas para contar UFC tanto de la conjugación como de la cepa receptora. La frecuencia de conjugación se expresó como $f = [\text{número de transconjugantes}] / [\text{número de receptoras}]$.

Transducción

Las transducciones fueron realizadas para intercambiar construcciones entre cepas de *S. meliloti* según el protocolo de Finan et al. 1984 (Finan, et al., 1984). Para el lisado, 10 ml de un cultivo de bacteria donadora crecidos en LB en presencia de 2.5 mM de $CaCl_2$ y 2.5 mM de $MgSO_4$ hasta una DO_{600} =0.4 – 0.5 fueron inoculados con 100 μ l de lisado. El cultivo se dejó en agitación durante 12 hs. En ese momento se pudo observar la lisis y los restos celulares. El lisado se esterilizó con 1 ml de $CHCl_3$ y se centrifugó para separar las fases. El lisado se guardó en ausencia de $CHCl_3$ a 4 °C. La cepa receptora se creció en LB con $CaCl_2$ y $MgSO_4$ hasta una DO_{600} = 0.4 – 0.5. Para la transducción, 900 μ l de cultivo de bacteria receptora se mezclaron con 100 μ l de lisado y se dejaron en contacto por

10 minutos a 28 °C con agitación. Posteriormente se centrifugó 2 minutos a 2400 rpm para bajar las células y se lavaron con LB (sin sales). Las células fueron resuspendidas en 100 µl de LB y plaqueadas en medio LB selectivo. Paralelamente se plaquearon controles de fago sin cultivo receptor (control de esterilidad del fago) y cultivo receptor sin fago. En este protocolo es de especial importancia respetar los tiempos de incubación de la bacteria donadora con el fago transductor, ya que demasiado tiempo de incubación puede generar infecciones múltiples y un decaimiento de la eficiencia de transducción.

II.2. Técnicas de Biología Molecular

II.2.1 Construcciones genéticas y manipulación de ADN

Las metodologías generales de ingeniería genética se realizaron según Sambrook et al. (Sambrook, *et al.*, 1989).

Preparaciones de ADN plasmídico

Las preparaciones de ADN plasmídico se realizaron por el método de lisis alcalina a mini escala (miniprep) y el ADN fue purificado utilizando un protocolo basado en unión a sílica (SiO₂) (Rappleye, 2004).

Purificación de ADN Plasmídico basado en unión a sílica: Para este procedimiento se requieren 2 soluciones adicionales a las utilizadas en el método de la lisis alcalina:

- *Suspensión de sílica:* a 2 g de sílica se le agregan 15 ml de agua y se centrifuga a 2000xg por 2 minutos. Esta etapa se repite 3 veces y se resuspende en un volumen final de 2 veces el volumen de sílica.
- *Solución de lavado:* 50 mM NaCl, 10 mM Tris 7.5, 2.5 mM EDTA, 50% Etanol

La lisis bacteriana se realiza según el protocolo de lisis alcalina (Sambrook, *et al.*, 1989). Luego de la precipitación con acetato de potasio 3M pH=5.4, se recoge el sobrenadante y a este se le agrega la cantidad apropiada de sílica (capacidad de unión de aprox. 200 ng de ADN / µl de suspensión). Se centrifuga 10 segundos a máxima velocidad y se lava tres veces con 500 µl solución de lavado. Se centrifuga a máxima velocidad y se seca el precipitado al aire. Para la elución se agrega el volumen deseado de TE, agua o tampones 1x para enzimas de restricción, y se incuba 5 minutos a 60 °C. Se centrifuga y se guarda el sobrenadante.

Purificación de bandas de gel de agarosa

La recuperación de ADN a partir de bandas de gel de agarosa se realizó utilizando el método basado en unión a sílica, con las siguientes modificaciones:

La banda a recuperar se cortó con un bisturí y se colocó en un tubo de polipropileno de 1,5 ml. A continuación para disolver la agarosa, se agregó 5 veces el volumen de la banda de solución de NaI 6M. Luego se incubó a 55 °C hasta disolución completa de la agarosa y se agregó 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M pH=5. Luego se agregó el volumen apropiado de suspensión de sílica (capacidad de unión de aprox. 200 ng de ADN / µl de suspensión). Se centrifuga 10 segundos a máxima velocidad y se lava tres veces con 500 µl solución de lavado. Se centrifuga a máxima

velocidad y se seca el precipitado al aire. Para la elución se agrega el volumen deseado de TE, agua o tampones 1X para enzimas de restricción, y se incuba 5 minutos a 60 °C. Se centrifuga y se guarda el sobrenadante.

Preparación de ADN total de *S. meliloti*

A partir de un cultivo puro de S. meliloti

Para la preparación de ADN total de *S. meliloti* se tomaron bacterias crecidas en medio sólido (aprox. una punta de *tip*) o líquido, indistintamente, y se resuspendieron en 100 µl de N-lauril sarcosina al 0,1% en TE. Luego se centrifugaron (10.000xg 2 minutos) y se lavaron con solución 1M de NaCl. A continuación, se centrifugó y el sedimento se resuspendió en 250 µl de TE suplementado con sacarosa al 20%. Se agregaron 250 µl de lisozima 5 mg/ml en TE. Esta mezcla se incubó 1 hora a 37 °C. Posteriormente se agregaron 50 µl de una solución de Pronasa 10 mg/ml y 5% de N-lauril sarcosina en TE, se mezcló por inversión y se incubó a 37 °C durante 1-2 horas. Transcurrido este tiempo, se agregaron 70 µl de una solución de acetato de sodio 3M, 200 µl de fenol equilibrado con tris pH=8 y 100 µl de cloroformo. Se agitó suavemente y se centrifugó durante 15 min. a 10.000xg. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo y se precipito el ADN por agregado de 1 volumen de isopropanol o 3 volúmenes de etanol. Se centrifugó 15 min. a 10.000xg. El sedimento se lavó con etanol 70%, se dejó secar al aire. Finalmente, se resuspendió en el volumen deseado de agua o TE (en general 25-50 µl) y se añadió 1 µl de una solución 1mg/ml de RNAsa. Alternativamente para la purificación del ADN se utilizó el método basado en la unión a sílica descrito anteriormente.

Determinación de concentraciones de ADN

Para determinar la concentración y calidad de las preparaciones de ADN se midió la absorbancia a 260 y 280 nm. Para ello se utilizó un equipo Nanodrop ND1000 (Nanodrop Technologies) según las especificaciones del fabricante.

Electroforesis en geles de agarosa

La verificación de las preparaciones de ADN y la separación de fragmentos de restricción se llevó a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa de concentración entre 0,8% y 1,5% en tampón TBE (Tris 89 mM, EDTANa₂ 2,5 mM, H₃BO₃ 89 mM, pH 8,2). Para la visualización del ADN, los geles de agarosa se prepararon con bromuro de etidio (0,5 µg/ml). El voltaje de trabajo se varió entre 5 y 12 volts/cm según los tamaños a separar. Como solución de carga se utilizó sacarosa 40% y azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 µl solución de ADN/1 µl solución de carga.

Posteriormente la presencia de bandas de ADN se observó con luz UV de 260 nm en transiluminador. El registro de los geles se realizó por fotografía con una cámara digital.

El tamaño de los fragmentos de restricción se determinó por interpolación gráfica en curvas de calibración en las que se representó el logaritmo del peso molecular de los fragmentos de ADN frente a la movilidad relativa de los mismos. Como patrón se empleó ADN del fago lambda digerido con la endonucleasa de restricción *HindIII* y marcadores de peso molecular comerciales.

Tratamientos enzimáticos del ADN

Las digestiones con enzimas de restricción, se realizaron en las condiciones óptimas para las enzimas, siguiendo las indicaciones de temperatura y *buffer* indicadas por los proveedores comerciales (Fermentas, PROMEGA, Invitrogen), y las recomendaciones descritas por Sambrook *et al.* (Sambrook, *et al.*, 1989).

II.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR cuantitativa (qPCR)

PCR y oligonucleótidos

Los ensayos de PCR fueron realizados en ciclador *Bioer Thermal Cycler*. La composición final de las mezclas fue: 1x buffer Tris-HCl, 2 mM MgCl₂; 200 μM dNTP_s; 0,5 μM de cada cebador y 1 U de Taq polimerasa (Proveedor *PBL*).

La amplificación de los productos fue visualizada en geles de agarosa tal como fue indicado en la sección II.2.1.

Las secuencias de los desoxioligonucleótidos utilizados en este trabajo (Operon, Genbiotech) se presentan en la Tabla II. 4. Los oligonucleótidos y las condiciones de reacción utilizados para la amplificación en tiempo real de las firmas de las muestras provenientes de los ensayos mencionados en el Capítulo VI-VII se encuentran en la sección II.4.5.

Tabla II. 4. Secuencia de oligonucleótidos utilizado en este trabajo.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de firmas se encuentran en la tabla II.6

Nombre	Secuencia	Modificación 5'	
OriR6Ki-Rv	CGTTACATCCCTGGCTTGTT	--	Capítulo III
OriT-RP4-Rv	AAAAGGTACCGCTTTTCCGCTGCATAAC	--	Capítulo III
P1_Kpn-Cy3	AAAGGACGTGGTTTACGGGGC	Cy3	Capítulo V
P2_Kpn-Cy3	TATATGAATGCCGCCACCCCC	Cy3	Capítulo V
P3_Hind-Cy3	ATTTAACTCCCCTCCGCCGC	Cy3	Capítulo V
P4_Hind-Cy3	TAGTCCTGGTGCATTGAGCCC	Cy3	Capítulo V

II.3. Ensayos de plantas

II.3.1. Esterilización y germinación de semillas

En los distintos experimentos se utilizó *Medicago sativa* (alfalfa) cultivar Monarca como planta huésped y particularmente en los experimentos STM se utilizaron también semillas de *Pisum sativum* (arveja). Las semillas fueron en primer lugar desgrasadas por inmersión en etanol 96% durante 30 seg. Transcurrido este tiempo se descartó el etanol y se trató a las semillas con solución 20% (V/V) de lavandina comercial durante 5 minutos (concentración de NaClO equivalente a 55 g.l⁻¹ de Cl₂ activo). A continuación las semillas se lavaron 5-6 veces con abundante agua estéril y se dejaron húmedas en reposo durante 2 hs. A continuación, se extendieron en condiciones asépticas sobre placas Petri con agar agua 1,5% (P/V), y se dejaron finalmente en oscuridad a 28 °C por 24 hs para la germinación. Las semillas de arveja se dejaron en oscuridad por 72 hs para la germinación. Opcionalmente se realizaron controles del procedimiento de esterilización depositando semillas

escogidas al azar sobre placas de TY e inspeccionando si existía crecimiento bacteriano luego de la incubación de las placas a 28 °C por 48 hs.

II.3.2. Condiciones de cultivo

Todos los ensayos fueron realizados en una cámara de cultivo con un fotoperiodo de 16/8 hs luz/oscuridad, 25/18 °C de temperatura (día/noche), y 50% de humedad relativa.

II.3.3. Preparación de exudados radiculares

Para la generación de exudados radiculares, las semillas germinadas fueron transferidas a rejillas de acero inoxidable contenidas dentro de un vaso de precipitado de 100 ml. En este sistema, se agregó medio Fåhraeus (Fåhraeus, 1957) hasta 1 cm por debajo de la rejilla (aproximadamente 50 ml). Las plántulas que entraron en contacto con el medio mineral se dejaron crecer por 7 días de modo de colectar los exudados radicales que pasaban al medio líquido. La composición del medio mineral Fåhraeus se detalla en la Tabla II.5

Tabla II. 5. Composición del medio mineral Fåhraeus para el cultivo de plantas. (Fåhraeus, 1957)

Medio Mineral de Fåhraeus	g/l	Solución Micronutrientes (1000X)	g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,114	KCl	3,73
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12	H ₃ BO ₃	1,55
Citrato Férrico	0,005	SO ₄ Mn·H ₂ O	0,85
KH ₂ PO ₄	0,1	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,13
Na ₂ HPO ₄	0,15	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,58
Solución de Micronutrientes	1ml	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,01

II.3.4. Re-aislamiento de los rizobios de nódulos radicuales

Los nódulos fueron separados de la planta y esterilizados en superficie con H₂O₂ 20% durante 10 min. Seguidamente los nódulos fueron lavados con agua estéril 5-6 veces, y luego macerados en 500 µl de medio TY, en condiciones asépticas con una varilla de madera. Una gota del macerado se extendió sobre placas de medio TY con antibióticos para identificar rizobios que expresen patrones específicos de resistencias.

II.4. Ensayos STM

II.4.1. Traslado y conservación de mutantes STM

Las mezclas de mutantes construidas por el grupo Alemán poseen una característica que, si bien no es fundamental, es deseable al inicio de cualquier experimento STM: la concentración de cada mutante en la mezcla es equivalente. Teniendo esto en cuenta, buscamos la manera de transportar las mezclas al país manteniendo esta relación. En este sentido, cualquier tratamiento o crecimiento beneficiará al conjunto de mutantes que no estén afectados en esa condición frente a los que sí lo están, generando de esta manera disparidades. Si un mutante se ve muy afectado, se perderá en esa mezcla y no podrá formar parte del conjunto estudiado.

Las mezclas de mutantes fueron centrifugadas y el concentrado de células (aproximadamente 1,5x10⁹ células) fue resuspendido en una solución buffer fosfato, conteniendo

un bajo porcentaje de proteínas, CaCl_2 y agarosa (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,44 g/l Na_2HPO_4 , 0,2 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l triptona, 0,6 g/l extracto y 0,1 g/l de CaCl_2 y agarosa 7 g/l pH=7). Estos tacos solidificados fueron enviados al país y procesados para extraer la mayor cantidad de mutantes del mismo. Sobre la solución de mutantes obtenida se realizaron diluciones seriadas para obtener en placas de medio TY sólido del orden de 5×10^4 colonias, sobre la placa se agregó medio líquido que se utilizó para desprender la mayor cantidad de bacterias posibles. Esta solución de bacterias obtenida fue llevada a $\text{DO}_{600}=12$ con medio líquido y glicerol (concentración final 20%) y fraccionada de a 150 μl . Las mezclas se preservaron a -80°C .

II.4.2. Desafío de mezclas de mutantes en condiciones de colonización de rizósfera de plantas de alfalfa y arveja

Esquema de trabajo. Inóculo inicial y mezcla de entrada

Para la preparación del inóculo inicial las mezclas conservadas a -80°C fueron crecidas durante pocas generaciones (no más de 4), hasta una DO_{600} aproximada de 0,2 – 0,3. Este cultivo, que representó la mezcla de entrada, fue utilizado para preparar el inóculo inicial diluido en medio Fåhreaus (aproximadamente una dilución 1:3000). El cultivo de mezcla de entrada fue procesado de igual manera que las muestras de planta (sección siguiente), y a partir de un único cultivo se realizaron 4 réplicas de extracción de ADN y 4 reacciones de amplificación (4 réplicas técnicas de la mezcla de entrada).

Para los desafíos de las 15 mezclas de mutantes el trabajo se dividió en tres etapas, en donde en cada etapa se desafiaron 5 mezclas. El inóculo inicial se utilizó para inocular 12 macetas (4 macetas para el procesamiento 3 d.p.i. de plantas de Alfalfa y 8 macetas para el procesamiento 7 d.p.i. de Alfalfa y Arveja, 4 réplicas biológicas de cada condición).

Ensayos y procesamiento de plantas

En macetas plásticas de 330 ml agujereadas en su base se colocó vermiculita estéril (aproximadamente hasta los 200 ml). Posteriormente se procedió a inocular las macetas por inundación con aproximadamente 200 ml de cultivo de bacterias (diluido a concentración aproximada de 1×10^5 ufc/ml en medio mineral Fåhreaus). El inóculo inundado fue descartado. Sobre cada maceta se colocaron correctamente entre 10 y 12 semillas de alfalfa. Para el caso de arveja se colocaron entre 4 y 5 semillas. Las macetas fueron cultivadas según lo indicado en la sección II.3.2. por un período de 3 días (3dpi) o 7 días (7 dpi).

A los tiempos indicados, con mucho cuidado se extrajo el material soporte junto con las plantas. Las plantas extraídas a los 3dpi fueron resuspendidas en 5ml de medio Fåhreaus y tratadas en vórtex durante 20s. A los 7 d.p.i., tanto a las plantas de alfalfa como de arveja se les cortó la parte aérea y sus raíces fueron resuspendidas primero en 10ml de Fåhreaus y tratadas en vórtex durante 20s. Posteriormente, las mismas se lavaron en 50ml de agua para extraer la población laxamente asociada remanente (LA). Las raíces lavadas fueron resuspendidas en 5ml de Fåhreaus y tratadas en baño de sonicación durante 10 min para extraer la población firmemente asociada (FA).

El conjunto de condiciones y mezclas desafiadas representaron un total de 300 muestras de salida que fueron preservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

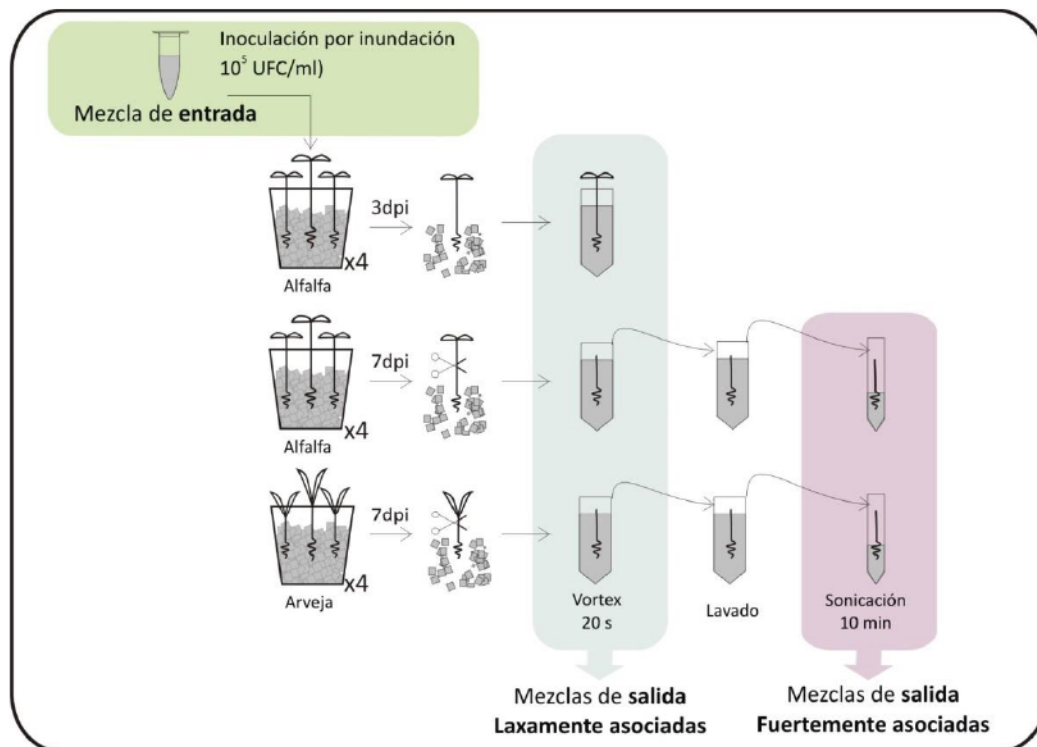


Figura II. 1. Esquema del procesamiento de plantas en los ensayos STM realizados en esta tesis.

Macetas con vermiculita fueron inundadas con inóculo de mezclas de mutantes en una concentración 1×10^5 ufc/ml (reservado como mezcla de entrada), posteriormente sobre el soporte se coloraron semillas previamente germinadas. A los 3 d.p.i las raíces fueron extraídas de las macetas y resuspendidas en medio Fåhraeus y tratadas en vortex durante 20 s, las bacterias en solución fueron reservadas como mezcla de salida 3d.p.i. A los 7d.p.i se extrajeron las plantas de alfalfa y arveja a las que se les cortó la parte aérea. Las raíces fueron resuspendidas en medio Fåhraeus y tratadas en vortex durante 20 s para extraer la población LA. Las raíces fueron después lavadas en H_2O estéril, resuspendidas nuevamente en medio mineral Fåhraeus y sonicadas durante 10 min para extraer la población FA. Todas las muestras extraídas fueron procesadas según lo indicada en la sección II.4.3 y II.4.4.

II.4.3 Almacenamiento de muestras STM

Las muestras extraídas de las plantas según lo indicado en la sección anterior se trataron como se indica a continuación: 1,8 ml de muestra fueron mezclados con 200 μl solución de lisis 10X (Solución de lisis 10X: 0,5 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA, 0,5 M NaCl pH 8). Los 2ml de muestra se centrifugaron 10 min a máxima velocidad. Posteriormente se extrajo con cuidado 1,8 ml del sobrenadante, de manera que quedaran 200 μl de solución de lisis 1X conteniendo las bacterias provenientes de plantas. Las muestras fueron reservadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y procesadas según lo indicado en la sección siguiente.

II.4.4. Extracción de ADN a partir de las muestras extraídas de raíz

Sobre los 200 μl de solución de lisis 1X conteniendo las bacterias según se indicó en la sección II.3.5: La extracción de ADN se realizó mediante el agregado de 4 μl de lisozima (5mg/ml) y

una posterior incubación a 37 °C durante 30 minutos. Luego se agregaron 5 µl de pronasa K (20mg/ml) y se incubó a 50 °C durante 1 h. Finalmente se incubó a 100 °C durante 10 min para finalizar con la lisis e inactivar la pronasa K. El ADN se concentró mediante el agregado de 5 µl de Acetato de Sodio 3 M y 200 µl de isopropanol, se centrifugó durante 15 minutos a máxima velocidad, se volcó el sobrenadante, la muestra se dejó secar a 37 °C y finalmente se resuspendió en volúmenes de entre 10 µl y 20 µl de agua. Estas muestras fueron utilizadas para realizar las amplificaciones de las firmas tal como se encuentra indicado en la sección I.2.2. Por reacción se utilizaron 2,5 µl de molde. Las mezclas provenientes de las mezclas de entrada fueron diluidas 10 veces (1/10), el resto de las muestras fueron utilizadas de manera directa.

II.4.5. Amplificación de firmas

Oligonucleótidos

Los extremos 5' de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de firmas fueron diseñados por combinación de 4 bases al azar y el agregado 5' de una adenina común a todos. Los mismos fueron sintetizados por *Eurofins Operon USA* utilizando un servicio que ofrece placas de cebadores normalizados por concentración (10 nanomoles de cada uno). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados junto con la condición/mezcla a la que fueron asociados se encuentra en la tabla II.6.

PCR en tiempo real (qPCR)

Las reacciones de qPCR para el seguimiento de las muestras de ADN de los experimentos STM fueron realizadas en el ciclador térmico en tiempo real *qTOWER (Analytik Jena)* utilizando el kit "Maxima Sybr Green qPCR master mix" de *Thermo Scientific*. El volumen final de la mezcla de reacción fue 10 µl, la concentración final de cada oligonucleótido en la mezcla fue 0,6 µM y se utilizó 2,5 µl de molde. Las condiciones del ciclado utilizado fueron las siguientes: Desnaturalización inicial 95 °C, 10 min; 35 ciclos x (desnaturalización 95 °C 10 s; hibridación 65 °C 5 s; elongación 72 °C 15 s).

II.4.6. Generación de la mezcla de productos de amplificación para secuenciamiento

La mezcla para el secuenciamiento se conformó con cantidades aproximadamente equivalentes de cada uno de los productos de amplificación. Para esto se tuvo en cuenta la intensidad máxima alcanzada por cada reacción al final de la reacción de PCR (intensidad de fluorescencia obtenida para cada tubo en el *plateau*). El criterio empleado fue el siguiente: aquellas reacciones que presentaron máximos de intensidad de fluorescencia entre 5×10^3 y 1×10^4 se mezclaron en un volumen 40% mayor (3,5 µl) al volumen utilizado para los casos donde los máximos de fluorescencia eran mayores a 1×10^4 (2,5 µl). Si el máximo de intensidad resultaba aún menor a 5×10^3 , el volumen utilizado fue 80% mayor que el empleado para las mezclas de intensidad 1×10^4 (4,5 µl). Para la mezcla final, las muestras provenientes de la mezcla N° 11, procesamientos Alfalfa 3 d.p.i. y Arveja FA 7 d.p.i. no fueron tenidas en cuenta dado que en la etapa de amplificación de firmas se evidenció que la cantidad inicial de ADN no era suficiente para garantizar la representatividad de las firmas de todos los mutantes.

Tabla II. 6. Oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones de las firmas presentes en las muestras STM.

Para las amplificaciones se utilizaron combinaciones de un oligonucleótido Fw (F1-G3) y un Rv (B5-C12).

Posición	Indica	Descripción	Firma K	Firma H
Rv - B5	CONDICION	Alf 3dpi R1	AGTATAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AGGGTATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - B6	CONDICION	Alf 3dpi R2	ACAGAAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AACTAATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - B7	CONDICION	Alf 3dpi R3	ACTTTAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AGCCGATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - B8	CONDICION	Alf 3dpi R4	AGTAAAAGGACGTGGTTACGGGGC	ACAGAATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - B9	CONDICION	Alf 7dpi L R1	AGTACAAAGGACGTGGTTACGGGGC	ACCACATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - B10	CONDICION	Alf 7dpi L R2	ACTTCAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AAATAATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - B11	CONDICION	Alf 7dpi L R3	ATGTCAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AATGTATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - B12	CONDICION	Alf 7dpi L R4	ATCTTAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AAACGATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C1	CONDICION	Av 7dpi L R1	AAAATAAAGGACGTGGTTACGGGGC	ATGTTATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C2	CONDICION	Av 7dpi L R2	ACTCCAAAGGACGTGGTTACGGGGC	ATCTGATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C3	CONDICION	Av 7dpi L R3	AAGACAAAGGACGTGGTTACGGGGC	ATATGATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C4	CONDICION	Av 7dpi L R4	AATCAAAGGACGTGGTTACGGGGC	ATCAGATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C5	CONDICION	Av 7dpi F R1	AAGAGAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AGGCGATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C6	CONDICION	Av 7dpi F R2	ATGTTAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AAGGAATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C7	CONDICION	Av 7dpi F R3	AGTTGAAAGGACGTGGTTACGGGGC	ACGCCATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C8	CONDICION	Av 7dpi F R4	AGCAGAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AACAGATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C9	CONDICION	INPUT R1	AGGTGAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AGTAAATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C10	CONDICION	INPUT R2	AAATGAAAGGACGTGGTTACGGGGC	AGAGGATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C11	CONDICION	INPUT R3	ACTCAAAGGACGTGGTTACGGGGC	ACGTTATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Rv - C12	CONDICION	INPUT R4	AGGCCAAAGGACGTGGTTACGGGGC	ACATTATTTAACTCCCCTCCGCCGC
Fw - F1	POOL	POOL 1	AGTGTATATGAATGCCGCCACCCCC	AAAGGTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F2	POOL	POOL 2	ATACTTATATGAATGCCGCCACCCCC	AGTGTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F3	POOL	POOL 3	ACGTATATATGAATGCCGCCACCCCC	AAAATTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F4	POOL	POOL 4	ACTTATATATGAATGCCGCCACCCCC	ATCTTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F5	POOL	POOL 5	AGACCTATATGAATGCCGCCACCCCC	ACGCATAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F6	POOL	POOL 6	AGCAATATATGAATGCCGCCACCCCC	ATGGCTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F7	POOL	POOL 7	ATTGCTATATGAATGCCGCCACCCCC	AAGCTTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F8	POOL	POOL 8	AGCGGTATATGAATGCCGCCACCCCC	ACCACTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F9	POOL	POOL 9	AGTTGTATATGAATGCCGCCACCCCC	ATAGGTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F10	POOL	POOL 10	AGAGGTATATGAATGCCGCCACCCCC	ATCTGTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F11	POOL	POOL 11	ACTTTTATATGAATGCCGCCACCCCC	ATGTGTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - F12	POOL	POOL 12	ACACATATATGAATGCCGCCACCCCC	AGACCTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - G1	POOL	POOL 13	ACCAGTATATGAATGCCGCCACCCCC	AGTTATAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - G2	POOL	POOL 14	ACGTTTATATGAATGCCGCCACCCCC	AGTCCTAGTCTGGTGCATTGAGCCC
Fw - G3	POOL	POOL 15	ATCTTTATATGAATGCCGCCACCCCC	ACGCTTAGTCTGGTGCATTGAGCCC

II.4.7. Secuenciamiento y procesamiento de datos

El secuenciamiento de la mezcla de productos de amplificación fue realizado con la plataforma *HiSeq 1500* de *Illumina* en el CeBiTec (*Center for Biotechnology*) Bielefeld, Alemania. Como resultado se obtuvieron $2,36 \times 10^8$ lecturas totales (37 Gbytes de información).

El resultado final del secuenciamiento de alta penetración de todos los productos de PCR deriva en la necesidad del contaje de firmas sobre la secuencia de los mismos, y en la identificación de los *tags* 5' y 3' para reconocer tratamiento, réplica y número de mezcla de mutantes. La búsqueda de secuencias (firmas, *tags*) o en forma más general de *cadena*s (sucesión particular de caracteres en el lenguaje de programación) en secuencias de ADN, es un proceso de cálculo frecuentemente requerido en muchas herramientas bioinformáticas. Si bien el proceso de búsqueda en forma

secuencial es rápido para pocas secuencias, el tiempo de cálculo aumenta linealmente con el número de las mismas.

Como hemos mencionado, en este trabajo el total de secuencias a analizar sumaron 236 millones de secuencias dando un total 37 Gigas de información. Con tal cantidad de información a analizar, para realizar el conteo de firmas se adaptaron algoritmos de búsquedas de cadenas como el algoritmo de Knuth-Morris-Pratt o el algoritmo de Boyer-Moore (Boyer & Moore, 1977, Nicola, *et al.*, 1993). Estos algoritmos reducen sustancialmente el tiempo de búsqueda debido a que utilizan tanto los fallos como los aciertos en el reconocimiento de la cadena y de esta forma no leen todos los caracteres de la misma. Asimismo, para disminuir aún más el tiempo de procesamiento, utilizamos la paralelización de los procesos de búsqueda. La lógica de dicha paralelización siguió la lógica metodológica. De esta forma, creamos bases de datos parciales para cada uno de los primers utilizados (*Kpn* y *Hind*). A su vez, para cada tipo de primer, creamos un índice de las combinaciones posibles entre condiciones, firmas y mezclas considerando la correspondiente metodología experimental. Utilizando estas combinaciones se procedió al conteo de las mismas. Se descartaron aquellas secuencias más cortas o no conteniendo el número esperado de condiciones, firmas y pools (secuencias incompletas). Con el resultado del conteo, se procedió a agrupar cada condición con su correspondiente número de mezclas.

Utilizamos programas escritos en el lenguaje de programación C para buscar y contar las combinaciones de condiciones, firmas y mezclas. Además estos programas se combinaron con scripts escritos en lenguaje bash. Los programas y los scripts, así como todo el proceso de búsqueda y conteo se corrieron en un cluster de servidores multinúcleo de la marca Dell. El mismo, consta de tres servidores: un nodo "frontend" consistente en un Dell PowerEdge R715 con 2 procesadores AMD Opteron 2,1 GHz, de 16 núcleos cada uno, 32 Gb de memoria RAM, 3Tb de almacenamiento en 6 discos rígidos HotPlug SATA II, convenientemente arreglados en 2 RAIDs, un nodo de cómputo Dell PowerEdge R815 de 2U, consistente en 4 procesadores AMD Opteron 6272 2,1GHz, de 16 núcleos cada uno, 64Gb de memoria RAM, almacenamiento de 1Tb por disco rígido HotPlug SATA II, y finalmente otro nodo de cómputo similar al precedente pero con 4 procesadores AMD Opteron 6168 1,8GHz, de 12 núcleos cada uno.

Los programas utilizados son tres, y se encuentran disponibles en la página Web del grupo del Dr. Gustavo Parisi, UNQ: <http://ufq.unq.edu.ar/sbg/index.html>, solapa Softwares.

A partir de estos datos, en el análisis de una mezcla en una condición dada, cada firma fue asociada con cuatro valores de lecturas de las "muestras de entrada" y a cuatro valores de lecturas de las "muestras de salida" (en el caso de que alguna muestra haya resultado no procesable se tomaron tres valores). Cada valor de lecturas fue normalizado por el valor total de lecturas obtenidas para la reacción de amplificación a la cual pertenecían. Los valores normalizados fueron promediados y a partir de este dato promedio se calcularon los valores M^{STM} para cada una de las firmas según se indica en la siguiente sección..

II.4.8. Microarreglos

Los arreglos mTn5-STM-1 contienen oligonucleótidos de 23 pb con modificaciones C12-amino en el 5'. Estos oligonucleótidos son complementarios a las 824 firmas (412 x 2) presentes en los transposones. Cada vidrio (*slide*) contiene 4608 posiciones (*spots*) en 16 cuadrantes, y cada cuadrante está formado por 18 filas y 16 columnas. Cada oligonucleótido se encuentra al menos 4 veces en el arreglo (Pobigaylo, 2006, Pobigaylo, *et al.*, 2006).

Amplificación y purificación de productos de PCR

Las muestras de entrada y salida (3 d.p.i.) provenientes de la mezcla N° 1 de mutantes fueron amplificadas con oligonucleótidos 5' modificados con Cy3. Las condiciones de amplificación utilizadas fueron similares a las mencionadas en la sección II.4.5.

Los productos de amplificación se purificaron utilizando el kit comercial QIAquick Nucleotide Removal Kit – QIAGEN y posteriormente fueron concentrados en el concentrador de vacío SpeedVac a 30 °C durante 20 min.

Hibridación

La composición de las soluciones utilizadas tanto para el bloqueo de los arreglos como para el lavado posterior a la hibridación se encuentran en la tabla II.7. La impresión de los arreglos fue realizada utilizando "Quantifoil QMT epoxy slides" y antes de la hibridación se deben realizar una serie de tratamientos para bloquear los grupos exoxy libres:

- 5 min a temperatura ambiente en 250 ml de Solución de enjuague 1
- 2 min a temperatura ambiente en 250 ml de Solución de enjuague 2
- 2 min a temperatura ambiente en 250 ml de Solución de enjuague 2
- 10 min a temperatura ambiente en 250 ml de Solución de enjuague 3
- Lavado 1 min a temperatura ambiente con H₂O (calidad MiliQ)
- 15 min a 50 °C en 200ml de Solución de bloqueo (previamente conservada a 50 °C) en constante movimiento (*shaker*)
- Lavado 1 min a temperatura ambiente con H₂O (calidad MiliQ)
- Centrifugar los arreglos durante 3 min a 1200 rpm

Los productos se resuspendieron en 135 µl de solución DIG Easy Hyb y 1,5 µl de esperma de salmón (5mg/ml). Antes de la hibridación los productos se desnaturalizaron durante 3 min a 95 °C. Las hibridaciones fueron realizadas en el equipo de hibridación Tecan HS 400 Pro, durante 45 min a 36 °C. Después de la hibridación, los arreglos se lavaron 2 veces con solución 2 x SSC, 0,2% SDS durante 5 min a 30 °C y posteriormente, dos veces con 0,5% x SSC durante 2 minutos a 20 °C. Los arreglos se escanearon utilizando el escáner Genepix 4000B Microarray scanner (Molecular Devices).

Tabla II. 7. Composición de las soluciones utilizadas para el bloqueo y posterior lavado de los arreglos.

Solución de lavado 1	250 ml MiliQ H ₂ O 250 µl Triton X 100	Solución de lavado 2	500 ml MiliQ H ₂ O 50 µl 32 % HCl
Solución de lavado 3	225 ml MiliQ H ₂ O 25 ml 1M KCl	Solución de bloqueo	150 ml MiliQ H ₂ O 47 µl 32 % HCl 50 ml 4 × QMT Blocking solution
20 × SSC	3M NaCl 0,3 M Na ₃ - Citrato pH 7,4	2 x SSC, 0,2%SDS	50 ml 20 x SSC 10 ml 10 % SDS 440 ml MiliQ H ₂ O
		0,5 x SSC	12,5 ml 20 x SSC 488 ml MiliQ H ₂ O

Análisis de datos

Las imágenes fueron procesadas utilizando el Software TIGR SpotFinder v.3.2.1. y a partir de cada posición del arreglo se obtuvo un valor de fluorescencia. El valor de intensidad de cada posición fue normalizado por la suma total de intensidades en todo el arreglo (% de fluorescencia). Los datos fueron analizados para obtener de cada vidrio un valor promedio de % de fluorescencia de todas las posiciones (réplicas) de una misma firma. A su vez, los valores obtenidos para los vidrios de cada una de las cuatro réplicas técnicas/biológicas fueron promediados. Los valores así obtenidos fueron llamados %_E y %_S en referencia a intensidades de entrada y de salida, respectivamente. De esta manera, para cada una de las firmas K y H quedó definido un único valor de %_E e %_S. De la misma manera para los datos obtenidos por secuenciación los valores de lecturas asociados a cada una de las firmas de cada mezcla de amplificación fueron normalizados por la cantidad de lecturas obtenidos para el total de esa amplificación. Los valores normalizados de cada una de las replicas fueron promediados obteniéndose los valores de %L_E e %L_S (porcentaje de lecturas a la entrada y salida, respectivamente, de manera similar que %_E y %_S). La comparación de los valores de intensidad y lecturas normalizados se realizó utilizando el valor M^{STM} , calculados de la siguiente manera:

$$M^{STM} = \log_2 (\%L_S / \%L_E)$$

Finalmente, para cada una de las firmas se realizó una *prueba t* (Student) para evaluar si los datos de intensidades eran o no significativamente diferentes.

II.4.9. Experimentos de co-inoculación en rizósferas de plantas de alfalfa y arveja.

Los experimentos de competición por la colonización de rizósferas de plantas de alfalfa y arveja fueron realizados utilizando un esquema similar al mencionado en la sección II.4.2 para los desafíos de las mezclas de mutantes. Los inóculos fueron preparados con cantidades aproximadamente equivalentes de cada bacteria (Salvaje: 2011MP6 (tabla II.2) y mutante), en una concentración final aproximada de 1×10^5 UFC/ml. La proporción exacta de salvajes y mutantes al inicio y al final del experimento fue evaluada por plaqueo de diluciones en medio Ty con Sm y

posterior recuento de bacterias que presentaron fluorescencia verde (salvajes) sobre totales (la proporción de mutantes fue obtenida como 1 – proporción de salvaje).

A partir de los datos de proporción de mutante y salvaje evaluados al inicio y al final del cada experimento de validación, se calculó el valor M^{plaqueo} de la siguiente manera:

$$M^{\text{plaqueo}} = \log_2 (\% \text{ Mutante}_S / \% \text{ Mutante}_E) - \log_2 (\% \text{ Salvaje}_S / \% \text{ Salvaje}_E)$$

Obsérvese que de esta manera todos los valores de M obtenidos para los experimentos de individuales fueron llevados a un valor $M^{\text{plaqueo}} = 0$ para la cepa salvaje.

II.5. Observación de fluorescencia verde debida a la expresión de GFP

La observación del desarrollo de fluorescencia verde en colonias bacterianas fue realizada mediante la utilización de una lupa Leica MZFL III, bajo iluminación con una lámpara de mercurio de 480 nm de longitud de onda.

II.6. Bases de datos utilizadas

La distribución de los mTn5-STM en el genoma de *S. meliloti* fue consultada en GenDB dentro de la plataforma Rhizogate <http://www.cebitec.uni-bielefeld.de/CeBiTec/rhizogate/>.

La asociación de genes con productos génicos y su respectiva clasificación fue realizada con la base de datos Rhizobase <http://genome.microbedb.jp/rhizobase/>.

Capítulo



Nueva herramienta para estudios transcriptómicos diferenciales por tecnología RIVET: Construcción y validación de un transposón mini-Tn5 para la generación de fusiones transcripcionales al gen de la resolvasa (TnpR).

III.1. Introducción

III.1.1. El estudio de la simbiosis en nichos de difícil acceso con métodos ómicos. Metodologías generales: Estudios de expresión, y búsqueda de genes con impacto fenotípico.

Como hemos mencionado en la sección I.3 de esta tesis, los métodos moleculares para el estudio de interacciones pueden ser divididos al menos en dos grandes grupos. Por un lado, están aquellos métodos y tecnologías que tienen como criterio de búsqueda la detección de marcadores que modifican su expresión (ya sea a nivel transcripcional o traduccional) en etapas específicas de la simbiosis (ej. transcriptómica y proteómica clásicas, IVET (Mahan, *et al.*, 1993), RIVET (Camilli, *et al.*, 1994), entre otros). Por otra parte, están las aproximaciones experimentales orientadas a detectar genes que, independientemente de su patrón de expresión, son esenciales para manifestar el comportamiento fenotípico salvaje en simbiosis (ej. STM (Hensel, *et al.*, 1995), TraDis (Langridge, *et al.*, 2009)). Éstos últimos métodos permiten la identificación de genes cuyos mutantes presentan alteraciones simbióticas visibles. Ambas aproximaciones experimentales son valiosas y complementarias en el tránsito hacia la comprensión de las bases bioquímicas de los procesos biológicos bajo estudio (simbiosis en este caso, interacciones patogénicas, etc.).

Las estrategias basadas en análisis fenotípicos proveen información directa respecto de los genes y productos que son importantes para la expresión de características específicas en las bacterias (como la aptitud simbiótica en nuestro caso). La fortaleza de estas aproximaciones se hará sólo evidente, sin embargo, siempre que se disponga de mutantes a saturación en el genoma, y de métodos de análisis (*screening* fenotípico) a escala ómica (evaluación de cientos/miles de mutantes en simultáneo). Como veremos en los capítulos IV a VI, en esta tesis usaremos este tipo de tecnologías para identificar marcadores genéticos asociados a las primeras etapas de la interacción de rizobios con raíces.

Por su parte, las estrategias que buscan marcadores sobre-expresados o reprimidos bajo condiciones particulares, contrastan con los métodos anteriores en que sacan a la luz genes cuya mutación puede derivar en la observación de fenotipos alterados, o no. En muchos casos la falta de fenotipos evidentes al alterar genes que cambian su expresión, muestra a estos métodos como menos espectaculares en el aporte inicial al conocimiento funcional del sistema. Sin embargo, debe tenerse particularmente en cuenta que la capacidad de evaluar alteraciones fenotípicas en el laboratorio es siempre limitada por razones muy diversas. Las observaciones en ensayos contenidos y con sistemas modelo (sin muchas de las condiciones que operan en ambientes naturales, usualmente muy acotados en espacio y tiempo, sin la posibilidad de seguir el sistema a mediano y largo plazo) no permiten analizar respuestas que el sistema no está -por diseño- en condiciones de ofrecer. En precisamente en estos casos donde los estudios de expresión (transcriptómicos/proteómicos) son muy valiosos, dado que nos permiten reconocer genes que, sin fenotipo asignable aún (genes que escapan a los estudios clásicos de mutagénesis, STM y TraDis), deben ser igualmente atendidos por modificar su expresión en circunstancias específicas del contexto biológico que se estudia. Deberá en consecuencia explorarse la razón del cambio de

expresión observado en un contexto de evaluación fenotípica más amplia, en condiciones que acerquen más al sistema a su contexto real.

III.1.2. La vida asociativa. Intercambio de señales, genes simbióticos.

El establecimiento de las simbiosis fijadoras de nitrógeno rizobio-leguminosa es el resultado de una compleja serie de eventos coordinados de comunicación y diferenciación entre ambos simbioses, planta y bacteria (Spaink, 2000, Gage, 2004, Oldroyd & Downie, 2008, Downie, 2010) (ver Introducción de esta tesis, sección I.2). La característica común a todas estas simbiosis es la formación de nódulos radicales ocupados por rizobios, con capacidad de fijar nitrógeno atmosférico a través de su actividad nitrogenasa. El nódulo radical que se forma es un órgano nuevo para la planta y, como otros, modifica drásticamente el metabolismo de la misma. Sin embargo, a diferencia de otros órganos el nódulo fijador de nitrógeno se desarrolla como consecuencia de la infección de la leguminosa por rizobios específicos. Es particularmente interesante de todos modos, que las leguminosas pueden inducir *per se*, con muy baja frecuencia, nódulos radicales vacíos en ausencia de rizobios. Dichos nódulos espontáneos, carentes de bacterias y de escasa significación funcional, muestran sin embargo que la planta posee toda la información básica para el desarrollo de la estructura nodular. La interacción con rizobios específicos dará lugar a la expresión de esa información en el momento y lugar precisos en el marco de la simbiosis. Ha existido así, a lo largo de la evolución, un momento en el que ambos organismos, planta y bacteria, debieron comenzar su diálogo mutualista para “incorporarse” el uno al otro dando lugar al nuevo territorio incipiente de lo simbiótico. Desde ese entonces y hasta hoy, han prevalecido las capacidades asociativas de los participantes por sobre su destino individual. En este marco, y aunque sin mención a la fijación de nitrógeno resultante, la expresión “interacción” simbiótica parece hacer un esfuerzo semántico en conservar la tradición del diálogo inicial (consúltese (Long & Staskawicz, 1993); y (Denison & Kiers, 2004); donde se discuten características comunes y diferenciales entre parásitos, patógenos y simbioses).

La caracterización molecular detallada (estructural y funcional) de los diferentes genes que son necesarios en la bacteria y en la planta para el correcto desarrollo de nódulos radicales maduros, es el desafío más importante que plantea actualmente el estudio de estas asociaciones (Oke & Long, 1999, Mathesius, *et al.*, 2001, Stougaard, 2001, Mathesius, *et al.*, 2002, Djordjevic, *et al.*, 2003, Weidner, *et al.*, 2003). El conocimiento preciso de los genes simbióticos y de sus funciones a lo largo de la preinfección, infección, y ontogenia del nódulo es un requisito imprescindible para abordar la manipulación y mejoramiento de las simbiosis con propósitos prácticos y sobre una base racional.

Aunque muchos genes implicados en la síntesis de productos relevantes para el desarrollo de las etapas tempranas y tardías de la simbiosis han sido caracterizados en detalle (ej. *nod*, *exo*, *lps*, *nif*, *fix*) (Long, 2001), poco se ha avanzado en la caracterización de genes simbióticos expresados en las etapas intermedias de la invasión radical. Esta deficiencia ha estado directamente ligada a la carencia de métodos adecuados de *screening* para la identificación específica de aquellos genes simbióticos que se expresan/son relevantes durante la interacción más temprana con la raíz (colonización), y durante la subsecuente penetración del pelo radical y desarrollo del canal de

infección. Lamentablemente, la caracterización molecular de estas etapas tempranas de la interacción donde la cantidad de rizobios en la rizósfera y dentro de la planta es aún muy escasa, hace difícil el uso de aproximaciones transcriptómicas y proteómicas clásicas.

En este capítulo trabajaremos en el diseño de nuevas herramientas RIVET y evaluaremos su eventual empleo en el estudio de la interacción simbiótica *S. meliloti-Medicago* spp. En los capítulos siguientes IV-VI evaluaremos y emplearemos tecnologías de STM para identificar genes del rizobio asociados a las primeras etapas de la interacción con la raíces de plantas hospedadoras y no-hospedadoras.

III.1.3. Abordaje al transcriptoma desde técnicas de expresión *in vivo* (RIVET, Recombination-based “In Vivo” Expression Technology) para la detección de marcadores simbióticos.

Herramientas transcriptómicas clásicas. En el año 2001 se ha culminado la secuenciación del genoma completo de la cepa modelo *S. meliloti* 1021 (Galibert, *et al.*, 2001) (hoy ya son 19 las cepas secuenciadas completamente (<https://img.jgi.doe.gov/>)), lo que ha permitido la construcción de un microarreglo de ADN con la colección completa de genes de dicho rizobio (Ruberg, *et al.*, 2003). Para el caso de la simbiosis *S. meliloti*-alfalfa se han estudiado en profundidad los perfiles transcriptómicos en condiciones específicas de **vida libre** (en distintas condiciones de crecimiento y/o estrés) (Cabanés, *et al.*, 2000, Ampe, *et al.*, 2003, Krol & Becker, 2004, Domínguez-Ferreras, *et al.*, 2006, Schlüter, *et al.*, 2013, Tiricz, *et al.*, 2013, Penterman, *et al.*, 2014) o **simbiosis** (nódulos jóvenes y maduros) (Ampe, *et al.*, 2003, Becker, *et al.*, 2004, Capela, *et al.*, 2006). Sin embargo, el **transcriptoma de rizobios en sus primeros estadios de interacción con la raíz ha sido muy poco estudiado**. Si bien la aproximación transcriptómica clásica es una alternativa muy valiosa para la caracterización de genes de expresión transitoria durante la infección, es limitada para la detección de genes expresados en bajos niveles y para el análisis de estadios simbióticos tempranos en los que la biomasa bacteriana dentro del hospedador (necesaria para el aislamiento del ARN de los rizobios y posterior preparación de las sondas de cADN) es muy baja. A pesar de estas limitaciones, Ramachandran *et al.* (2011) han podido recientemente caracterizar los transcriptomas de *R. leguminosarum* bv *viciae* durante la colonización de plantas de arveja y de alfalfa a los 7 d.p.i.. En este caso y en respuesta a las limitaciones antes mencionadas, los autores utilizan un título alto de rizobios (10^8 u.f.c.) para poder extraer suficiente cantidad de ARN (Ramachandran, *et al.*, 2011).

Nuevas herramientas transcriptómicas: Como hemos mencionado anteriormente (sección I.3.1), los sistemas de expresión *in vivo* del tipo RIVET funcionan como sensores de actividades promotoras *in vivo*, y constan de dos módulos para su funcionamiento. Por un lado el **módulo sensor** llamado “trampa de promotores” (**Módulo A**) que posee el gen sin promotor *tnpR* que codifica una recombinasa específica de sitio (resolvasa). Rio arriba de este gen sin promotor se realizan fusiones transcripcionales al azar con fragmentos del genoma de la bacteria en estudio. Si la región rio arriba del gen *tnpR* tiene actividad transcripcional en una condición determinada, la proteína TnpR se expresará. El segundo módulo del sistema es el **módulo indicador (Módulo B)**, que funciona como reportero de la actividad TnpR, y está constituido por un *cassette* de ADN flanqueado en sus extremos por secuencias de reconocimiento para la resolvasa (secuencias *res*). La escisión del

cassette (Módulo B) da lugar a un cambio fenotípico que permite diferenciar aquellos clones que, bajo condiciones específicas, expresaron la resolvasa como consecuencia de la actividad de promotores de interés. Este sistema ha sido utilizado para el estudio de numerosas interacciones microorganismo-hospedador (Camilli & Mekalanos, 1995, Wang, *et al.*, 1996, Lowe, *et al.*, 1998, Merighi, *et al.*, 2005, Osorio, *et al.*, 2005, Noel, *et al.*, 2010, Kroupitski, *et al.*, 2013), y la aplicación del mismo en la simbiosis fijadora de nitrógeno *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa ha sido objeto de trabajo en nuestro laboratorio durante la última década (tesis Dr. Mauricio Lozano, (Lozano, *et al.*, 2011, Lozano, *et al.*, 2013a)). En ese contexto hemos construido nuevas herramientas RIVET (Módulos A y B) en las que la expresión de la recombinasa genera, simultáneamente, no sólo la pérdida sino también la ganancia de una resistencia a antibiótico que permite por tanto la selección positiva de aquellos clones con promotores que encienden la expresión de *tnpR*. Dichas herramientas incluyen el diseño de un conjunto versátil de vectores (plásmidos replicativos, plásmidos integrativos, y herramientas transposicionales que describiremos a continuación en el presente capítulo) destinados a la generación de bibliotecas de fusiones transcripcionales al gen de la recombinasa *tnpR* (Lozano, *et al.*, 2011, Lozano, *et al.*, 2013a). Cabe destacar que el valor de las tecnologías RIVET radica en que, luego del desafío de las bacterias con el hospedador, al final del ensayo podrán recuperarse todos aquellos clones que en algún momento de la interacción (aun en localizaciones íntimas del huésped) hayan expresado la regiones promotoras fusionadas a *tnpR* (sistema con “memoria”).

La experiencia adquirida durante los últimos años nos ha indicado que la generación de bibliotecas genómicas de buena calidad suele ser uno de los principales obstáculos para la aplicación exitosa de la técnica RIVET. La principal dificultad con la que nos hemos enfrentado ha sido la complejidad de obtener bibliotecas robustas con buena cobertura (decenas a centenas de miles de clones) de fragmentos genómicos no-quiméricos fusionados a la región río arriba de *tnpR*. La falta de calidad de las bibliotecas conlleva a la baja penetración del análisis en la búsqueda de zonas promotoras de interés dentro del genoma. Por esta razón, en la primera parte del trabajo de tesis, y con la expectativa de buscar genes simbióticos tempranos con la tecnología RIVET, diseñamos una nueva herramienta que permita generar fusiones genómicas a *tnpR* mediante el uso de transposones modificados, de modo de evitar la necesidad de generar bibliotecas en vectores plasmídicos.

III.2. Diseño y construcción de vectores trampa de promotores basados en el uso de un mini-transposon Tn5.

El uso de transposones Tn5 modificados como herramienta para generar fusiones transcripcionales fue reportado por primera vez en 1984 por Kroos *et al.* (Kroos & Kaiser, 1984) y luego por Simon *et al.* (Simon, *et al.*, 1989). En 1990 De Lorenzo *et al.* describieron el desarrollo y uso de una serie de mini-transposones derivados de Tn5 como estrategias de mutagénesis bacteriana. En estos mini-transposones las secuencias de inserción se encuentran reducidas a repeticiones invertidas de 19pb y el gen que codifica para la transposasa *tnpA* se encuentra codificado en *cis*, por fuera del transposón (de Lorenzo, *et al.*, 1990). Los mini-Tn5 conservan las ventajas propias del Tn5, como la capacidad de transponer con muy baja especificidad de secuencia y un rango relativamente

extendido de huéspedes, y -por carecer de la transposasa dentro del transposón- una vez que han transpuesto resultan elementos estables dentro del genoma.

Con el propósito de usar los eventos de transposición para generar bibliotecas de fusiones transcripcionales al gen *tnpR* de la resolvasa, abordamos la construcción de un plásmido portador de un mini-Tn5 que en uno de sus extremos contenga una fusión *tnpR-lacZ* sin promotor. La descripción de la construcción de dicho plásmido, que hemos designado pRIVETminiTn5-*tnpR-lacZ*, se presenta en la parte A de la Figura III.1. Si el transposón portador del gen *tnpR* (Módulo A) se integra de forma que río arriba se encuentre una región genómica con actividad promotora propiamente orientada, la resolvasa se expresará y producirá la escisión del *cassette* indicador (Módulo B). Para el diseño y construcción de esta herramienta se realizaron modificaciones sobre el vector de origen sintético pBAM1 (Martínez-García, *et al.*, 2011). Dicho vector contiene un mini-Tn5 que incluye un gen de resistencia a neomicina, y en los extremos sendas secuencias de 19 pb (designadas ME-I y ME-O) requeridas (y optimizadas) para la transposición. Por fuera del transposón se encuentra codificada una transposasa (*tnpA*) hiperactiva, un gen de resistencia a ampicilina (*bla*), un origen de transferencia derivado del plásmido RP4 de amplio rango de hospedador, y un origen de replicación R6K sólo funcional en bacterias que expresen la proteína π ("pi") (cepas λ -pir; Tabla II.3, Materiales y Métodos, sección II.1.2). Como se muestra en la Figura III.1.A., para la construcción del plásmido pRIVETminiTn5-*tnpR-lacZ* un fragmento *BglIII-XbaI* conteniendo la fusión *tnpR-lacZ* sin promotor fue liberado del plásmido pRIVET-R (Lozano, *et al.*, 2011) y ligado al vector pBAM1 digerido previamente con las enzimas *BamHI-XbaI*.

III.3. Construcción de una variante transposicional portadora de un origen de replicación funcional en *E. coli*.

El uso del plásmido pRIVETminiTn5-*tnpR-lacZ* como herramienta para generar bibliotecas de fusiones transcripcionales a *TnpR* ofrece en principio una alternativa metodológicamente más simple que el uso de plásmidos para generar bibliotecas RIVET. Con esta herramienta, una vez que el plásmido ingresa a la bacteria receptora, cada evento de transposición generará potencialmente un clon de la biblioteca (dependerá que la inserción ingrese a una región transcrita o no, y que lo haga además en *sense*). Sin embargo, el uso de transposones obliga de todos modos a una etapa de clonado genómico al final del desafío para recuperar la inserción del transposón y caracterizar el ADN que lo contiene y que controla la transcripción de la resolvasa. Con el objetivo de facilitar la recuperación de las secuencias flanqueantes al transposón, una vez identificado un clon con actividad TnpR en la condición estudiada, se construyó una variante de vector que incluye un origen de replicación, funcional en *E. coli* (Figura III.1.B). El origen de replicación derivado del plásmido p15A fue digerido como un fragmento *NheI-XbaI* y clonado en el sitio *XbaI* del plásmido pRIVETminiTn5-*tnpR-lacZ* dando como producto de ligación el plásmido pRIVETminiTn5-*tnpR-lacZ-oriV*.

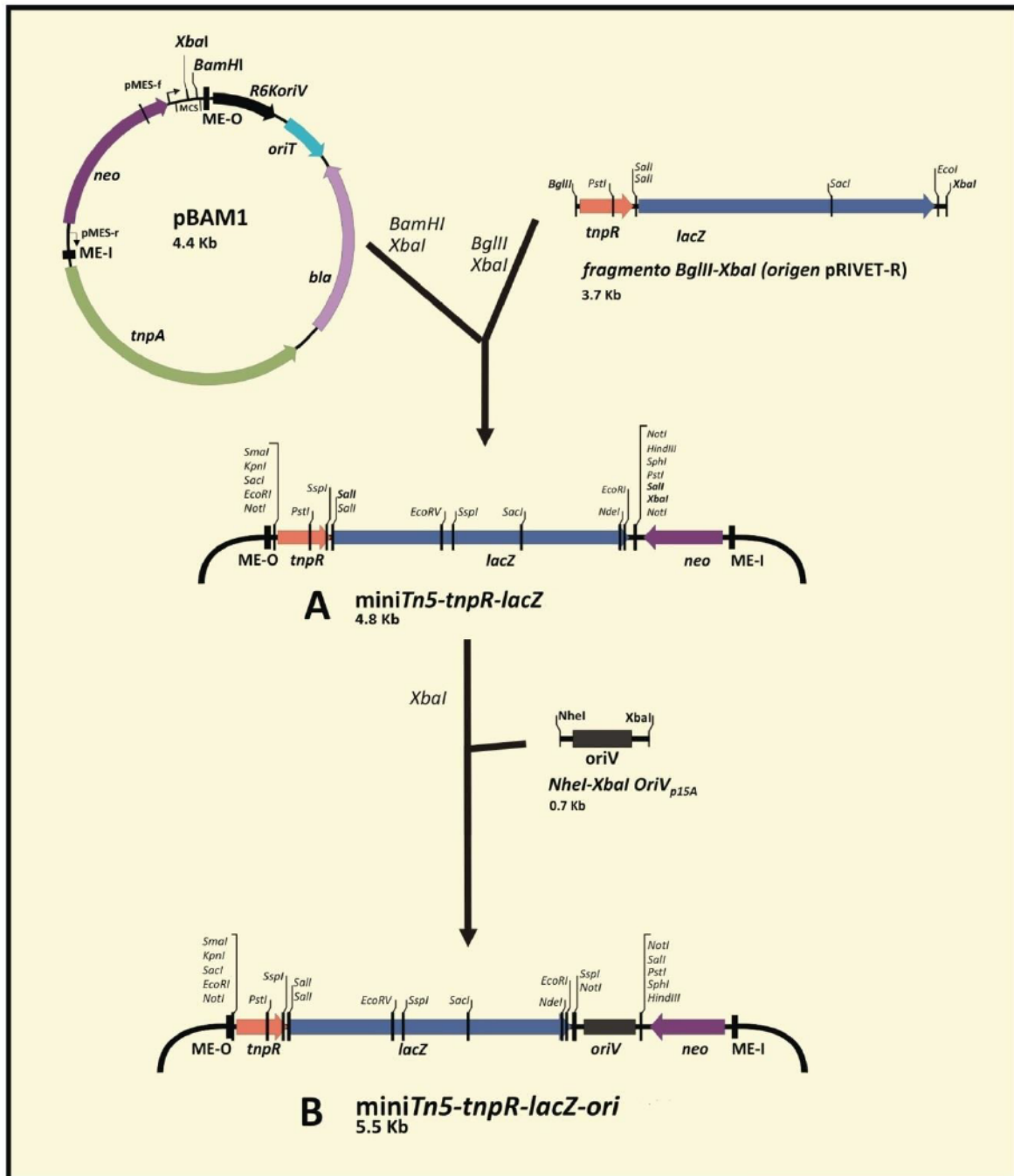


Figura III. 1. Estrategia utilizada para la construcción de los vectores que contienen los transposones miniTn5-tnpR-lacZ (A) y miniTn5-tnpR-lacZ-oriV (B).

A. El fragmento *BglIII-XbaI* proveniente del plásmido pRIVET-R fue insertado de manera orientada en el pBAM1 digerido con las enzimas *BamHI* y *XbaI*. El plásmido resultante, pRIVETminiTn5-tnpR-lacZ, contiene la trampa de promotores *tnpR-lacZ* en el extremo del transposón y a continuación un gen de resistencia a neomicina. B. El origen de replicación derivado del plásmido p15A fue digerido como un fragmento *NheI-XbaI* y clonado en el sitio *XbaI* del plásmido pRIVET-miniTn5-tnpR-lacZ dando como producto de ligación el plásmido pRIVETminiTn5-tnpR-lacZ-oriV. Todas las construcciones fueron analizadas por su patrón de restricción.

Esta modificación en el vector, permite que una vez identificado un clon con actividad promotora de interés, las secuencias que flanquean el transposón puedan ser recuperadas por una digestión total del ADN de la bacteria, una posterior auto-ligación y transformación en *E. coli*. Las construcciones obtenidas fueron pensadas con el objetivo de ser utilizadas en *S. meliloti* pero además, ofrecer a la comunidad científica nuevas herramientas para construir bibliotecas de fusiones transcripcionales para estudios RIVET de manera más simple. En la siguiente sección presentaremos la evaluación funcional de las herramientas construidas en diferentes bacterias Gram negativas.

III.4. Validación funcional de las herramientas construidas.

El uso de las herramientas construidas para generar bibliotecas de fusiones transcripcionales será dependiente de la capacidad que estas tengan de transponer con una frecuencia que permita generar, en unos pocos ensayos, un número alto de fusiones transcripcionales al gen *tnpR*. Por este motivo, evaluamos la frecuencia de transposición de las herramientas que hemos construido en tres géneros bacterianos diferentes, incluida la cepa de nuestro interés *S. meliloti* 2011. Para evaluar la frecuencia de transposición, a partir de la cepa donadora SM10- λ pir portadora de las construcciones, se realizaron conjugaciones a las cepas *E. coli* HB101 (Sm^R - Rif^R) (Boyer & Roulland-dussoix, 1969), *Burkholderia tropica* Mto293 (Nal^R) (Estrada-De Los Santos, *et al.*, 2001) y *S. meliloti* 2011- Nal^R (J. Dénarié., Francia). Los transconjugantes fueron seleccionados en medio con kanamicina (Km) y estreptomycin (Sm) en el caso de *E. coli*, y en medio con Km y ácido nalidíxico (Nal) para los casos de *B. tropica* y *S. meliloti*. Las frecuencias de transposición fueron calculadas como la proporción de transconjugantes/número de bacterias receptoras (Tabla III.1). Las frecuencias de transposición que se muestran en la tabla son puras, dado que fueron corregidas teniendo en cuenta los eventos de integración de los vectores suicidas (ver pie de la tabla). Puede observarse que la frecuencia de transposición en los rizobios resultó cerca de 350 veces más baja que la observada en *E. coli* (frecuencias intermedias se observaron en *B. tropica*). En *S. meliloti*, además, cerca de 1 cada 10 clones Str^R - Nal^R obtenidos al plaquear la conjugación correspondieron a un evento de integración.

Por último se evaluó la capacidad de esta herramienta de generar fusiones que logren producir una TnpR funcional que sea capaz de escindir un *cassette* de ADN flanqueado por sus sitios de reconocimiento (*res* o *res1*). Esta frecuencia de escisión fue evaluada en la cepa indicadora *S. meliloti* *res1*- Ω Tc-*res1* (Lozano, *et al.*, 2011, Lozano, *et al.*, 2013), que posee integrado en su genoma un *cassette* indicador (Módulo B) formado por una resistencia a tetraciclina flanqueada por los sitios de reconocimiento de la resolvasa (variante *res1*, (Camilli, *et al.*, 1994)). El plásmido pRIVETminiTn5-*tnpR*-lacZ-oriV fue transferido por conjugación desde la cepa *E. coli* SM10- λ pir a la cepa indicadora, y los rizobios Str^R - Km^R obtenidos fueron evaluados en la pérdida de la resistencia a tetraciclina como medida de actividad de la resolvasa TnpR activa. En un experimento como el anterior es esperable que muestren actividad todas aquellas transposiciones que hayan tenido lugar en genes no-letales, y en “*sense*” sobre regiones transcriptas en las condiciones en que las bacterias fueron manipuladas y luego plaqueadas (en medio TY rico, (Beringer, 1974)). En tales condiciones observamos escisión del *cassette* indicador *res1*- Ω Tc-*res1* \rightarrow *res1*-*res1* con una frecuencia de

11,5±2,7%, lo que demuestra la funcionalidad de las fusiones transcripcionales que se generan a partir de la herramienta que hemos presentado en este capítulo.

Tabla III. 1. Frecuencia de transposición y de los miniTn5-RIVET que hemos construido, y de integración de sus plásmidos portadores, en diferentes cepas receptoras.

Construcción	Cepa donadora	Cepa receptora	Frec. de transposición	Integración
pRIVETminiTn5- <i>tnpR-lacZ</i>	<i>E. coli</i> SM10- λ pir	<i>E. coli</i> HB101	1,49 ± 0,34 × 10 ⁻³	<1
pRIVETminiTn5- <i>tnpR-lacZ</i>	<i>E. coli</i> SM10- λ pir	<i>B. tropica</i> Mto293	7,27 ± 3,47 × 10 ⁻⁵	8,7
pRIVETminiTn5- <i>tnpR-lacZ-oriV</i>	<i>E. coli</i> SM10- λ pir	<i>S. meliloti</i> 2011	4,18 ± 2.96 × 10 ⁻⁶	9,1

Los valores de las frecuencias de transposición fueron calculados como el número de transjugantes Km^R / célula receptora, corregido por los eventos de integración. El porcentaje de integración en *E. coli* fue estimado a partir de la proporción de bacterias Amp^R (ampicilina, la resistencia a antibiótico codificada en el esqueleto de plásmidos portador del minitransposón) respecto de las bacterias Km^R-Str^R (total de transjugantes). Los porcentajes de integración en *S. meliloti* y *B. trópica* fueron calculados a partir de la proporción de clones positivos para una reacción de PCR dirigida al origen de replicación R6K del plásmido, respecto a los transjugantes totales (Km^R-Nal^R). Los errores en las frecuencias de transposición corresponden a la desviación estándar del valor medio.

III.5. Consideraciones finales.

III.5.1. Evaluación de las posibilidades del uso en *S. meliloti* de la herramienta que hemos desarrollado.

Una vez evaluada la nueva herramienta, analizamos la posibilidad de usar la misma para el estudio de los primeros estadios de interacción de *S. meliloti* con raíces. Disponíamos ya de un módulo B de selección positiva que ante el aumento de la actividad TnpR da lugar a la aparición de resistencia a gentamicina, y en simultáneo de fluorescencia verde por expresión de GFP (ver figura I.7, Lozano, *et al.*, 2011). Tal módulo indicador de selección positiva era una posibilidad valiosa para facilitar el *screening* de fusiones transcripcionales que pudieran activarse por señales específicas del hospedador. Las limitaciones al uso de RIVET con herramientas transposicionales en *S. meliloti* derivaron esencialmente de las muy bajas frecuencias de transposición obtenidas en nuestra bacteria de interés. Así, para obtener por ejemplo una decena de miles de fusiones, hemos calculado requerir cerca de medio centenar de conjugaciones independientes asumiendo que en cada una empleamos del orden de 10⁸ rizobios aceptores para que la muestra resulte procesable en los plaques selectivos. Hemos observado que los plaques directos de conjugaciones con alta densidad celular conducen con regularidad a la generación de pátinas de crecimiento inespecífico, que imposibilitan la identificación de los transjugantes de interés. Así, la necesidad de diluir la resuspensión de la conjugación para acceder a los clones buscados amplifica por un factor de 10 el procesamiento experimental de cada conjugación (acercándonos así al medio millar de placas para abordar la construcción de la biblioteca que hemos planteado). En la estimación anterior debe tenerse en cuenta que para obtener estadísticamente la cantidad expresada de fusiones a *tnpR* en *sense*, deben generarse el doble de clones transpuestos. Aunque posiblemente no representen una molestia, debe tenerse también en cuenta que entre los clones transpuestos tendremos, indistinguibles y mezclados con ellos, aproximadamente un 10% de integraciones espurias del propio vector portador del mini-transposón según los refleja la Tabla III.1. Lamentablemente, la frecuencia

de transposición que hemos observado en *S. meliloti* para nuestra construcción resultó varios órdenes de magnitud inferior a las frecuencias que habían sido reportadas por Martínez-García et al. (2011) para el mini-Tn5 del pBAM1 en otras bacterias gran negativas como *Pseudomonas putida*. Este hecho limitó de modo determinante el uso del sistema transposicional en nuestro rizobios modelo.

III.5.2. Alternativas experimentales para el estudio de etapas simbióticas tempranas.

Como consecuencia de las dificultades asociadas a la generación de bibliotecas RIVET por transposición se hizo necesario evaluar alternativas metodológicas que nos permitieran abordar la búsqueda de marcadores asociados a la simbiosis temprana. **Al momento de definir el tipo de estrategia a utilizar, fueron publicadas/dispusimos de la siguiente información y posibilidades metodológicas:** **A)** Acceso al transcriptoma de una bacteria rizosférica por técnicas convencionales. En el año 2011 se reportó el acceso al transcriptoma de *R. leguminosarum* bv *viciae* cuando coloniza raíces homólogas (arveja) y heterólogas (alfalfa, caña de azúcar), gracias al uso de una etapa de amplificación de ARN “sense”, luego de la extracción de ARN y previo a la marcación fluorescente de cDNA y al uso de microarreglos (Ramachandran, et al., 2011). Ciertamente la elección de una estrategia como la anterior no enfoca de modo sólido la detección de expresiones transientes como si lo hace el RIVET, pero soslaya entre otros inconvenientes aquellos asociados a la generación de bibliotecas de fusiones a *tnpR*. **B)** A través de una colaboración con el laboratorio de la Dra. Anke Becker accedimos a la posibilidad de hacer uso inmediato de una biblioteca de mutantes miniTn5 etiquetados con firmas, para experimentos de evaluación fenotípica asistidos por STM (*Signature Tagged Mutagenesis*) (ver Introducción de esta tesis sección I.3.2.) **C)** Asimismo, en los últimos cinco años a un cambio logarítmico en la capacidad de secuenciamiento paralelo de ADN (accediendo cómodamente a las decenas de Gb, y hasta la Tb) que nos permitió re-analizar el mejor abordaje estratégico para la identificación de las funciones de *S. meliloti* asociadas a su interacción temprana con las raíces de *M. sativa* (alfalfa). La nueva capacidad de secuenciación no sólo permite abordar de un modo diferente el *screening* en sistemas RIVET (siempre con la necesidad de contar al inicio con bibliotecas de fusión de buena calidad), sino también realizar abordajes como el de Ramachandran et al. (2011) pero a través de *northern* *in silico*, ó intentar un estudio a saturación por STM usando miles de mutantes en búsqueda de genes asociados a deficiencias simbióticas tempranas. Si bien hasta hoy los ensayos de STM han hecho uso de microarreglos en su fase analítica final, las **potencialidades del diseño experimental al usar secuenciamiento paralelo de alta capacidad** (número de tratamientos simultáneos analizables, accesibilidad a experimentos de una magnitud diferente, detección final como producto de salida de mutantes alterados en la condición fenotípica analizada) hicieron que la herramienta STM fuese la opción de preferencia para abordar el objetivo central de este trabajo de tesis. En los capítulos siguientes IV al VI presentaremos la evaluación, puesta a punto y aplicación de herramientas basadas en el uso de STM para la identificación de genes de los rizobios requeridos para la colonización inicial de la rizósfera y el rizoplano de raíces de alfalfa.

Capítulo IV

Selección fenotípica de mutantes de *S. meliloti* alterados en la colonización temprana de raíces de alfalfa, empleando mutantes transposicionales etiquetados con firmas (STM).

Parte I. Diseño General del Ensayo.

IV.1. Introducción.

IV.1.1. Espacio limitado del nicho simbiótico. Competitividad para la nodulación. Colonización rizosférica.

Según hemos indicado en la introducción de este trabajo, la simbiosis entre rizobios y leguminosas constituye un asociación que resulta de una compleja serie de eventos a lo largo de los cuales se producen cambios secuenciales en ambos participantes, producto de un diálogo molecular muy activo que guía la diferenciación tanto de la bacteria como de regiones específicas de la raíz de la planta huésped (Downie, 2014). Dicho diálogo, culmina con la **formación de nódulos radiculares maduros fijadores de nitrógeno atmosférico, cuyo número está cuidadosamente controlado (limitado) por la planta.** Así, alcanzado un cierto número de infecciones radiculares, consistente con las necesidades de nitrógeno de la planta, la misma controlará de modo estricto el inicio de infecciones nuevas (Caetano-Anolles & Gresshoff, 1991, Gage, 2004). Por tanto, atento a que el espacio simbiótico es limitado, **aquellos rizobios que sean más aptos para alcanzar la planta e infectarla (los más competitivos) serán los que mayoritariamente ocuparán los nódulos formados.** Lamentablemente, no siempre los rizobios más competitivos para la nodulación son los que presentan las mayores capacidades de fijación de nitrógeno. Por ello, el conocimiento y manejo de **las características que hacen a los rizobios más competitivos representa un conocimiento valioso hacia la selección, mejoramiento y formulación de inoculantes de buena calidad.**

En los últimos treinta años, numerosos estudios han abordado la búsqueda y caracterización de mecanismos y componentes de los rizobios asociados a la expresión de su competitividad para asociarse con la planta (para revisiones ver (Triplett & Sadowsky, 1992, Savka, *et al.*, 2002)). Las evidencias disponibles actualmente muestran que la competitividad para la nodulación resulta de la expresión fenotípica de un conjunto complejo de características de los rizobios. La capacidad de colonizar más o menos efectivamente el nicho simbiótico depende de la presencia de componentes y actividades de los rizobios que favorecen el proceso de asociación, tanto durante la pre-infección como dentro del huésped. En tal sentido se ha reportado la importancia para la competitividad de algunos polisacáridos superficiales en rizobios noduladores de alfalfa y poroto (Lagares, *et al.*, 1992, Milner, *et al.*, 1992, Araujo, *et al.*, 1994, Bittinger, *et al.*, 1997), y de sistemas de secreción tipo III en el caso particular de rizobios noduladores de *Lotus* (Sanchez, *et al.*, 2009). Por otra parte, existe evidencia en la que se describe como factor de competitividad positivo a la capacidad de utilizar metabolitos específicos como inositol (Fry, *et al.*, 2001, Jiang, *et al.*, 2001), glicerol (Ding, *et al.*, 2012), y prolina (Jiménez-Zurdo, *et al.*, 1995, Jiménez-Zurdo, *et al.*, 1997, van Dillewijn, *et al.*, 2001). Se han descrito asimismo como características positivas para la competitividad de los rizobios a la capacidad de los mismos de generar señales adecuadas hacia la planta -como formas específicas de los factores de nodulación (Lamrabet, *et al.*, 1999), a la capacidad de generar y tolerar toxinas (Triplett & Barta, 1987, Triplett, 1988, Triplett, 1990, Robleto, *et al.*, 1998), a la capacidad de disminuir las tasas de etileno generadas por la planta (Dominguez-Ferreras, *et al.*, 2009), y también a la mayor capacidad de tolerar estreses abióticos (Draghi, *et al.*, 2010). Además de las evidencias precedentes vinculadas a la presencia de componentes/actividades que mejoran la competitividad

de los rizobios, se ha demostrado también que la movilidad y la quimiotaxis son factores importantes en leguminosas como alfalfa (Caetano-Anolles, *et al.*, 1988a) y soja (Althabegoiti, *et al.*, 2008).

Las evidencias precedentes indican que, si bien son varias las etapas de la simbiosis en las que pueden manifestarse diferencias de competitividad, los fenómenos que tienen lugar en la vida rizosférica temprana, son factores importantes para definir cuáles son las cepas que ocuparán el espacio simbiótico. Por esa razón es que en el presente trabajo enfocamos caracterizar el comportamiento de los rizobios frente al huésped desde los primeros momentos en que se incorporan a la rizósfera, esto es, a la región de influencia radicular donde ya se observan fenómenos de competencia. Lamentablemente, a pesar del conocimiento detallado actual del proceso de infección y desarrollo de nódulos por los rizobios, es aún escaso el conocimiento de base sobre las etapas críticas de la colonización rizosférica y de los genes asociados a ella. Una limitación importante posiblemente haya sido la escasa cantidad de células que deben utilizarse en los inóculos experimentales (y por tanto disponibles a lo largo del ensayo) para emular condiciones de colonización con títulos de rizobios similares a los naturalmente existentes en las cercanías de la raíz. En este sentido, algunos trabajos recientes han reportado el estudio de los transcriptos de *R. leguminosarum* bv *viciae* inducidos en rizósfera de arveja mediante la utilización de metodologías in vivo (IVET, (Barr, *et al.*, 2008)) y en rizósferas de arveja y alfalfa mediante el uso de microarreglos (Ramachandran, *et al.*, 2011). Estos trabajos han aportado conclusiones generales sobre la vida rizosférica de los rizobios, además de poner en evidencia efectos específicos asociados a la planta huésped, y reconocer también la inducción de muchos genes de función aún desconocida. Sin embargo, si bien en dichos estudios se han caracterizado perfiles de expresión génica diferencial en la rizósfera, en los mismos no se ha caracterizado el impacto fenotípico de cada uno de los marcadores sobre la colonización radicular.

IV.1.2. Abordaje a la identificación, a escala ómica, de marcadores genéticos asociados a fenotipos específicos: Uso de mutantes etiquetados con firmas (STM). Antecedentes.

El sistema de mutagénesis etiquetada con firmas (STM, *Signature-Tagged Mutagenesis*) ha sido implementado en diferentes laboratorios, y utilizado con distintas bacterias para investigar cuáles son los genes/posiciones genómicas cuya integridad es importante para la expresión de fenotipos específicos (Pobigaylo, *et al.*, 2006, Pobigaylo, *et al.*, 2008, Borjigin, *et al.*, 2011). En algunos de esos ensayos se utilizaron mezclas de mutantes generados cada uno con un transposón (Tn) diferente, etiquetado con (al menos) una secuencia de nucleótidos que le es propia (“firma”), y que permite por tanto conocer la presencia y cantidad relativa de cada mutante en presencia de los otros. A partir de esta posibilidad, la estrategia experimental para la búsqueda por STM de genes vinculados a la expresión de un fenotipo dado puede resumirse en los siguientes pasos: a) generar una mezcla de mutantes con diferentes Tn en la que la proporción de cada mutante es conocida (proporción de firmas) [→mezcla de entrada, *input*] (las mezclas de entrada suelen construirse con proporciones similares de cada uno de los mutantes que la conforman), b) desafiar dicha mezcla frente a una condición biológica de interés [→etapa de selección], y c) evaluar al final del ensayo cómo ha cambiado la representación de cada mutante en el sistema [→mezcla de salida, *output*]. El análisis de la proporción de cada mutante en el inóculo de “entrada” y en la muestra de “salida” se

realiza a partir de preparaciones de ADN de las correspondientes mezclas de mutantes. Para ello se realizan PCRs de las regiones que contienen las firmas, analizando posteriormente la abundancia relativa de cada una de ellas por hibridación en microarreglos (Pobigaylo, *et al.*, 2006, Pobigaylo, *et al.*, 2008) o por secuenciamiento de alta penetración y recuento de firmas *in silico*. En un ensayo como el precedente, es esperable que al final del mismo pierdan representatividad en la mezcla de salida respecto de la de entrada aquellos mutantes que deriven en efectos negativos sobre el fenotipo analizado. Por el contrario, ganarán representatividad aquellos mutantes que tengan efecto positivo sobre el comportamiento de las bacterias en la condición ensayada.

IV.1.3. STM para el estudio de la bacteria simbiótica modelo *S. meliloti*. Aplicaciones a otros sistemas. Otras aproximaciones experimentales similares.

La técnica de STM para la caracterización fenotípica de mutantes de *S. meliloti* a escala genómica ha sido desarrollada, y empleada para algunas situaciones particulares, en el laboratorio de la Dra. Anke Becker (Alemania) (Pobigaylo, Wetter *et al.* 2006; Pobigaylo, Szymczak *et al.* 2008). Pobigaylo *et al.* (2006, 2008) desarrollaron inicialmente un conjunto independiente de 412 mini-Tn5 diferentes, caracterizados cada uno de ellos por incluir dos secuencias (“firmas”) de 24 nucleótidos cada una que son propias de cada transposón. Dichas firmas han sido designadas como firma H (por estar clonada entre dos sitios *HindIII*), y firma K (por estar clonada entre dos sitios *KpnI*). Empleando dichos transposones en *S. meliloti* pudieron reconocerse con éxito mutantes (genes) afectados en el crecimiento (de entre una colección de aprox. 400 mutantes totales) (Pobigaylo, *et al.*, 2006), así como mutantes afectados en simbiosis incluyendo defectos de competitividad para la nodulación, en la infección, y con nodulación retardada (todos ellos de una colección de cerca de 800 mutantes totales) (Pobigaylo, *et al.*, 2008). Cabe destacar que el uso de STM ha sido aplicado también con éxito a la caracterización de la simbiosis entre *Mesorhizobium loti* y *Lotus* habiéndose detectado 69 mutantes afectados en nodulación (3 *Nod⁻*, 10 *Fix⁻*, y 53 mutantes deficientes en su competitividad frente al rizobio salvaje) (Shimoda, *et al.*, 2008, Borjigin, *et al.*, 2011). Metodologías similares han sido aplicadas al estudio de genes asociados a diferentes fenotipos en bacterias tanto en vida libre como en asociación con sus huéspedes. Dichos estudios han incluido el uso de técnicas de STM propiamente dicha [incluyendo *Vibrio Cholerae* (Chiang & Mekalanos, 1998), *Staphylococcus aureus* (Schwan, *et al.*, 1998), *Streptococcusagalactiae* (Jones, *et al.*, 2000), *Streptococcus pneumoniae* (Hava & Camilli, 2002), *Helicobacter pylori* (Kavermann, *et al.*, 2003), y *Burkholderia multivorans* (Nagata, *et al.*, 2014)]; o de su variante TraDIS más reciente [incluyendo *Escherichia coli* (Eckert, *et al.*, 2011), *Salmonella Typhi* (Langridge, *et al.*, 2009), *Haemophilus influenzae* (Gawronski, *et al.*, 2009) , y *Bacteroides thetaiotaomicron* (Goodman, *et al.*, 2009)].

Según se describió en los Objetivos de este trabajo de tesis, en los capítulos que siguen abordaremos la aplicación de tecnologías asistidas por STM para la búsqueda de genes de *S. meliloti* relevantes para la colonización rizosférica y del rizoplano de *M. sativa*, y de raíces de plantas heterólogas (arveja). En el presente capítulo describiremos el diseño general del ensayo que hemos realizado y el ajuste de las principales condiciones y variables del mismo.

IV.2. Características de la biblioteca mini-Tn5-STM que se utilizará en este trabajo de tesis.

La biblioteca completa de mutantes de *S. meliloti* desarrollada por Pobigaylo et al. (2006) consta de 12.000 mutantes, distribuidos en 30 mezclas, donde cada mezcla contiene hasta 412 mutantes diferentes (generados con la colección de los 412 mini-Tn5 diferentes construidos). Nótese que si bien cada una de las 30 mezclas posee mutantes con el mismo juego de 412 transposones, los mutantes de cada mezcla son independientes (diferentes). Para abordar el estudio de genes involucrados en la colonización radicular temprana presentado en esta tesis hemos iniciado un trabajo en colaboración con el laboratorio de la Dra. Becker quien nos dio acceso a la biblioteca STM completa desarrollada por Pobigaylo et al. (2006). Una particularidad importante de la misma es que se conocen los sitios de inserción para la gran mayoría de los mutantes de las primeras 15 mezclas (cerca de 5.100 sitios de inserción) (http://synmikro.com/images/agbecker/primer/mapped_mTn5STM_Rm2011_mutants.txt). Por tanto, una vez identificados los mutantes afectados en el fenotipo de interés (colonización en nuestro caso), conociendo la mezcla (1 a 15) y la firmas H y K asociadas a cada uno de ellos (1 a 412), puede conocerse inmediatamente el gen o la estructura genómica interrumpida. Teniendo en cuenta que el número de mutantes es próximo al número de genes de *S. meliloti*, y que varios genes son además letales, con el uso de sólo 15 mezclas estaremos próximos a disponer de una inserción/gen suponiendo distribución uniforme de los mini-Tn5. Describiremos a continuación el diseño general del ensayo y los primeros análisis que hemos realizado, previo al desafío de las 15 mezclas frente a las raíces de alfalfa en busca de genes asociados a la colonización de la rizósfera y el rizoplaneo.

IV.3. Diseño del ensayo para estudiar colonización radicular con herramientas de STM.

IV.3.1. Condiciones experimentales. Consideraciones numéricas.

Como hemos mencionado en la sección precedente, la colonización radicular -y la competencia por la ocupación de ese nicho- depende de diferentes aptitudes de los rizobios para desenvolverse en el medio que circunda a la planta, blanco a su vez de factores abióticos y bióticos (muchos de ellos de estrés) muy diversos. Los genes asociados a la capacidad de colonizar raíces deberán reflejar así la capacidad de los rizobios de dar respuesta a variables muy diferentes que operan naturalmente en el ambiente periradicular.

Dada la complejidad del sistema, y orientados a identificar en este primer estudio genes de colonización que sean básicos para la interacción con la propia raíz minimizando complejidad y variaciones propias del suelo, decidimos estudiar la capacidad de colonización de los rizobios en un medio definido para el crecimiento de plantas (mineral de Fåhraeus sin nitrógeno), y en una matriz (inorgánica) como la vermiculita. Esta última condición ha sido escogida para generar un medio estructurado que favorezca la estabilidad de gradientes de composición que puedan originarse desde la raíz. Consideramos asimismo importante trabajar con una concentración de rizobios que se aproxime a los valores encontrados en suelos, de modo que la competición entre miembros de la misma especie tenga lugar bajo relaciones rizobios homólogos/raíz encontradas frecuentemente en condiciones naturales (no más que 10^5 rizobios/g de suelo, estimando entonces en el orden de 10^4 rizobios aquellos que puedan encontrarse en la región de influencia de una raíz pequeña). El inóculo

en bajos números impuso sin embargo una limitación experimental severa a los experimentos de STM, en tanto que condicionó varios aspectos del diseño del ensayo:

A) **Al inicio del ensayo:** En el inóculo inicial la representación de cada uno de los mutantes diferentes debe ser adecuada. Esto es, **debe contemplarse que las mezclas inoculantes iniciales (cada una con cerca de cuatrocientos mutantes diferentes) garantice ya desde el comienzo del ensayo – respetando los bajos números buscados- una buena representación de cada mutante en la zona de influencia de la planta.** Así, si se desea incorporar no menos de 50 células de cada uno de los 412 mutantes en las cercanías de la raíz, deberán inocularse no menos de 2×10^4 rizobios ($50 \times 412 = 2 \times 10^4$) en el volumen que está bajo influencia de la raíz. Si dicho volumen consideramos que puede ser del orden de un par de centenares de microlitros, el inóculo bacteriano deberá tener no menos 10^5 rizobios/ml.

B) **Al final del ensayo:** El número de rizobios recuperados de la rizósfera al final del ensayo luego de la colonización, debe ser lo suficientemente alto como para que, técnicamente, la extracción de ADN genómico de esos mismos pobladores rizosféricos y su procesamiento posterior (mediate amplificación de firmas por PCR, y recuento posterior de las mismas en arreglos/por secuenciación) permita el reconocimiento inequívoco de los mutantes que resultan afectados (o mejorados) en su capacidad de colonización radicular.

En las secciones que siguen hemos realizado diferentes ensayos piloto de colonización con el propósito de investigar todas las cuestiones anteriores.

IV.3.2. Inoculación de plantas: Título bacteriano de la mezcla inicial, periodo de incubación y poblaciones de bacterias adheridas laxas y firmes.

Es un hecho bien conocido que el entorno de la raíz está formado por poblaciones de bacterias en distinto grado de asociación con la planta (ej. pobladores de la rizósfera, bacterias unidas al rizoplano con distinta firmeza, e iniciadores de la colonización endofítica) (Rovira, 1965, Albareda, *et al.*, 2006, Rodríguez-Navarro, *et al.*, 2007). Es por lo tanto esperable que entre los mutantes desafiados existan rizobios con capacidades diferentes para abordar la colonización de la rizósfera y/o del rizoplano. Será por tal motivo interesante analizar si es posible discriminar entre genes asociados a una u otra fase de la colonización radicular. Explorar estas cuestiones requerirá entonces como primer paso analizar diferentes condiciones de lavado (suaves y enérgicas) que permita extraer bacterias asociadas a la raíz con distintos grados de firmeza, para definir luego poblaciones de un modo operativo práctico (experimental). Luego de algunos ensayos preliminares hemos optado por definir dos condiciones operativas de lavado, y dos poblaciones de rizobios de acuerdo a cómo son recuperadas de la raíz. Los rizobios que están más laxamente asociados a la raíz, extraídos mediante el uso de vortex durante 20 segundos, los designaremos de aquí en más como población “laxamente asociada” (LA) a la región radicular. Están por otro lado aquellos rizobios que forman parte de una más íntima asociación con la raíz, y que son extraídos mediante sonicación durante 10 minutos de las raíces a las que previamente se las trató para extraer la población LA. A los rizobios así extraídos los designaremos como población “firmemente

asociada” (FA) a la raíz. Los detalles metodológicos de ambos procedimientos se encuentran descritos en la sección II.4.2 de Materiales y Métodos.

Ya sea que al final del ensayo se analice la población de rizobios LA ó FA, según hemos discutido en la sección anterior es imprescindible controlar el número total inicial de bacterias inoculadas. Un alto título de rizobios en el inóculo, si bien representaría bien a todos los mutantes, podría “saturar” el sistema y enmascarar diferencias fenotípicas en la capacidad de colonizar de cada uno de ellos. Por el contrario, un título demasiado bajo de rizobios podría condicionar la adecuada representación de cada mutante en el entorno bajo influencia de la raíz. De acuerdo a las consideraciones de la sección anterior, **¿Cuál es entonces la concentración de inóculo más baja que se puede utilizar para que teniendo bien representados a todos los mutantes al inicio, y luego de un periodo corto de tiempo, sea posible recuperar de las raíces de las plantas una cantidad de bacterias que sea procesable para el recuento de firmas y la detección de mutaciones de interés?** La posibilidad de responder esta pregunta se encuentra condicionada por: a) El conocimiento del número de bacterias que pueden recuperarse de las raíces de las plantas a distintos tiempos después de la inoculación (esta sección), b) la disposición de un método eficiente de extracción de ADN de los rizobios obtenidos (ver sección siguiente IV.3.3), y finalmente c) el desarrollo de un ensayo de PCR específico para amplificar las firmas H y K, y con alta sensibilidad (a partir de moldes en bajos números)(ver sección siguiente IV.3.4). Las condiciones a) y b) son esenciales para obtener en el ADN de la muestra de salida un número absoluto de genomas que, si todas las clases de mutantes están presentes (los cerca de cuatrocientos), garantice la presencia de al menos 50-100 moléculas de cada genoma mutante (firma). La condición c) es imprescindible para poder amplificar dicha mezcla de firmas para su cuantificación (en microarreglos ó por secuenciamiento), manteniendo a lo largo de la PCR la proporción relativa de cada una de ellas tal como existía en la mezcla de bacterias extraídas de la rizósfera.

Relación entre el inóculo inicial y las bacterias extraídas. Evaluamos entonces en primer lugar la cantidad de bacterias LA que se extraen de raíces de plantas de alfalfa en función del tiempo y en función del título del inóculo. Para ello se inocularon macetas con vermiculita por inundación utilizando tres concentraciones de inóculo distintas (10^4 , 10^5 y 10^6 u.f.c./ml). Luego de la inoculación y el escurrimiento de las macetas, se colocaron plántulas de alfalfa de 1 día (véase Materiales y Métodos sección II.3.1). El sistema de inoculación se eligió para favorecer la distribución homogénea del inóculo, y obtener un contenido parejo del inoculante líquido en toda la maceta. Las plantas fueron extraídas a distintos tiempos (2hs, 1 día, 3 días, 7 días y 11 días) postinoculación, la vermiculita asociada a las raíces fue removida por agitación mecánica manual, y finalmente las plantas fueron resuspendidas en medio mineral y tratadas con vortex durante 20 seg para extraer bacterias de las raíces (población LA). Finalmente, se realizaron recuentos en placa de la suspensión resultante de bacterias. Los resultados del ensayo se muestran en la Figura IV.1. Los resultados muestran un aumento en el tiempo del número de rizobios de la población LA asociados a raíces, con un incremento de tipo “hiperbólico” que satura a los 3 días post-inoculación en recuentos del orden de 10^6 u.f.c./raíz, independiente del título inicial de bacterias utilizado.

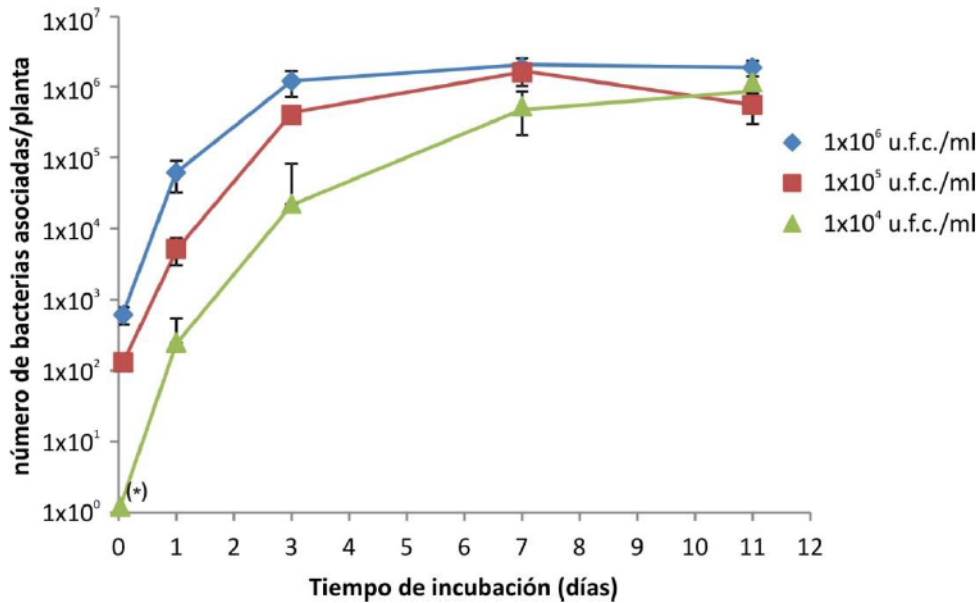


Figura IV. 1. Número de bacterias asociadas a raíces de alfalfa a distintos tiempos postinoculación, luego de su inoculación con diferentes dosis de bacterias.

Se inocularon plantas de alfalfa con 1×10^4 , 1×10^5 y 1×10^6 u.f.c./ml por inundación (ver texto y Materiales y Métodos sección II.4.2.). A distintos tiempos postinoculación, según se indica, las plantas fueron extraídas de las macetas, resuspendidas individualmente en medio mineral de Fåhreaus, y tratadas en vortex durante 10 segundos. El número total de bacterias asociadas a la raíz fue estimado por recuento en placa en medio TY. Para cada una de las condiciones se procesaron al menos 3 plantas independientes. Las barras de la figura corresponden al error estandar. (*) Para el tiempo 0 correspondiente al inóculo de 1×10^4 u.f.c./ml, el número de rizobios asociados a raíces pudo estimarse en menos de 10 u.f.c./ml (no se contó ningún rizobio al plaquear 100 μ l de un total de 1 ml en el que fue resuspendida la raíz).

La cinética de la gráfica IV.1. permite pensar a la colonización rizósferica como un proceso que involucra efectos tempranos de colonización activa (hasta los 3 d.p.i.) y efectos de estabilización más tardíos (a partir de los 3 d.p.i., *plateau* en la gráfica). Para diferenciar los determinantes genéticos asociados a una y otra etapa decidimos desafiar las mezclas de mutantes y obtener muestras de salida a estos dos tiempos (3 y 7 d.p.i.). Además, debido a la posible presencia de efectos de asociación más firme a los 7 d.p.i., decidimos utilizar las plantas a este tiempo para diferenciar entre la población LA y FA.

Para estimar la proporción de las poblaciones LA y FA existentes a un tiempo dado, se evaluó a ese tiempo la cantidad de bacterias que podían extraerse de las raíces de alfalfa utilizando ya sea vortex (población LA) o sonicación (población FA). En la Figura IV.2. puede observarse que a los 7d.p.i. las poblaciones LA y FA representan aproximadamente 80% y 20% de la población total extraíble de la raíz, respectivamente.

El análisis realizado muestra que la inoculación de 10^5 rizobios/ml (que según se ha discutido en la sección precedente IV.3.1. es razonable pensar que corresponderá a disponer de cerca de 50 representantes de cada uno de los mutantes/raíz), resulta al final de la colonización (sea a los 3 o 7 d.p.i.) en la recuperación de cerca de 10^6 rizobios/raíz de la población LA, y entre 10^5 - 10^6 rizobios de la población FA.

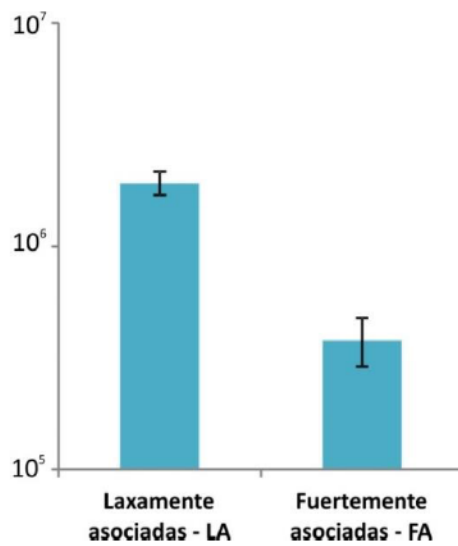


Figura IV. 2. Número de bacterias de la población LA y FA extraídas de raíces de plantas de alfalfa a los 7 d.p.i. (ver texto).

Para cada una de las condiciones se procesaron al menos tres macetas independientes, cada una con al menos 5 plantas. Las barras de la figura corresponden al error estándar.

Los resultados de estos ensayos sirvieron para conocer la magnitud de la colonización radicular en el tiempo en función del inóculo, y evaluar si los recuentos obtenidos se condicen con las condiciones discutidas precedentemente para satisfacer las condiciones de bajo inóculo buscadas y la buena representación de cada uno de los cuatrocientos mutantes de cada mezcla. A partir de los resultados obtenidos, en los ensayos que presentaremos en los próximos capítulos decidimos utilizar 10 plantas de alfalfa por condición experimental a analizar, y por réplica, de modo de contar con cerca de 500 representantes de cada mutante al inicio de cualquier ensayo en el conjunto de las 10 raíces a ser colonizadas. Con esas condiciones resulta esperable recuperar entre $10^7 - 10^6$ rizobios de las poblaciones LA y FA, respectivamente.

IV.3.3. Extracción de ADN del inoculante inicial y de los rizobios recuperados de raíz.

Una vez fijadas las condiciones para extraer bacterias rizosféricas en un número adecuado luego de 3-7 días postinoculación (ver sección precedente), abordamos la evaluación de un método de extracción de ADN que garantice la extracción eficiente del mismo a partir de dichas bacterias. A partir de los $10^7 - 10^6$ rizobios de las poblaciones LA y FA deberán recuperarse al menos 2×10^4 genomas como material de entrada a la reacción de PCR, para garantizar una representación de al menos 50 copias de cada firma de los cuatrocientos mutantes. Después de la extracción de ADN, la oferta de molde en cada tubo de PCR debe ser lo suficientemente alta como para que la reacción de PCR (cuya evaluación se presentará en la sección siguiente IV.3.4) continúe sosteniendo la relación de firmas existente en la mezcla de bacterias rizosféricas. Atento al elevado número de mezclas, réplicas y condiciones que se analizarán, debimos ensayar un método de extracción de ADN que resultara aplicable a la escala de nuestro diseño experimental completo. El método utilizado, que consistió en una lisis térmica de los rizobios facilitada por un tratamiento previo con lisozima y proteinasa K (ver Materiales y Métodos, sección II.4.4.), evitó extracciones fenólicas y precipitaciones con sus consecuentes pérdidas de rendimiento. Con el procedimiento de lisis térmica para extracción de ADN hemos recuperado un número de copias genómicas (estimado por q-PCR) siempre mayor al 10% del recuento de bacterias extraídas. Si bien la eficiencia de extracción puede ser considerada

baja, el procedimiento es simple de aplicar y partiendo de $10^7 - 10^6$ u.f.c. de la población LA y FA garantiza la obtención de 10^6 y 10^5 genomas para cada una de las muestras, lo que representa cinco veces la cantidad necesaria de 2×10^4 genomas para representar a todos los mutantes. Hemos evaluado extracciones de ADN con métodos alternativos más complejos (que involucraron el uso de SDS y fenol) y no hemos obtenido rendimientos superiores.

IV.3.4. Reacción de PCR para la amplificación de las firmas H y K. Cebadores utilizados.

Como hemos mencionado al comienzo de este capítulo, cada mini-Tn5-STM de la colección construida por Pobilgaylo et al. (2006) posee dos secuencias nucleotídicas variables de 24 nucleótidos designadas como firmas H y K por encontrarse localizadas entre sitios *HindIII* y *KpnI*, respectivamente, como se esquematiza en la Figura IV.3. Según analizamos en la sección IV.1.2 al inicio del capítulo, la cuantificación relativa de las firmas para cada mutante al inicio y al final de la colonización es lo que permitirá establecer si alguno de ellos ha disminuido o aumentado su representación en la rizósfera. La cantidad de copias genómicas en la preparación de ADN que resulta de la extracción de las bacterias recuperadas de raíz no es suficiente para la evaluación de firmas en microarreglos ni para su secuenciación y conteo por métodos bioinformáticos. Así, las reacciones de PCR que realizaremos con el ADN extraído de cada mezcla de entrada (inóculo) y de salida (bacterias rizosféricas) tienen dos objetivos principales: a) aumentar el número absoluto de firmas presentes, de modo que resulten cuantificables (sea en microarreglos o por secuenciación), y b) servir como etapa de marcado molecular de cada muestra (producto de PCR) para que luego del secuenciamiento pueda establecerse a qué condición/tratamiento y réplica corresponde cada una de las firmas que se cuentan. Por estas razones, se realizaron reacciones de amplificación por PCR con dos pares de cebadores que flanquean las firmas H y K (cebadores P1-P2 para la firma K, y cebadores P3-P4 para la firma H; ver Materiales y Métodos sección II.4.5). Tanto el par de cebadores P1-P2 como el par P3-P4 amplifican un fragmento de 102 pb que contiene los 24 pb correspondientes a la firma propia de cada uno de los transposones (ver localización de los cebadores en la Figura IV.3.). Como veremos con mayor detalle en el capítulo VI, nótese muy especialmente que P1, P2, P3, y P4 constituyen, cada uno de ellos, familias de cebadores con diferentes extremos 5' a modo de marcadores (o "tags"). Esto es, existen varios cebadores P1 diferentes, varios P2, etc. En particular, las primeras 4 bases del extremo 5' de la familia de cebadores P1 y P3 fueron utilizadas para indicar, en el producto amplificado, el tipo de tratamiento y réplica asociado a las firmas amplificadas (ej. si corresponde a una mezcla de entrada, o a una mezcla salida de los 3 ó los 7 d.p.i.; si corresponde a una inoculación de alfalfa ó de arveja; indicando además el número de réplica). Por su parte, las primeras 4 bases del extremo 5' de la familia de cebadores P2 y P4 fueron utilizadas para indicar, en el producto de PCR, el número de la mezcla de mutantes que ha sido amplificada (ej. mezcla 1 con el cebador P1-1, mezcla 2 con el cebador P1.2, etc.). Tengase en cuenta que los productos de amplificación por PCR de todas las mezclas y tratamientos serán en una última etapa mezclados, secuenciados, y finalmente clasificados para contar la cantidad de veces que una firma se encuentra presente en una mezcla; todo a partir de los "tags" de los cebadores de ambos extremos (para detalles de la estrategia de secuenciamiento de los productos etiquetados con los primers véase luego en el Capítulo VI la sección VI.2). Para el caso de TraDis, y como alternativa a

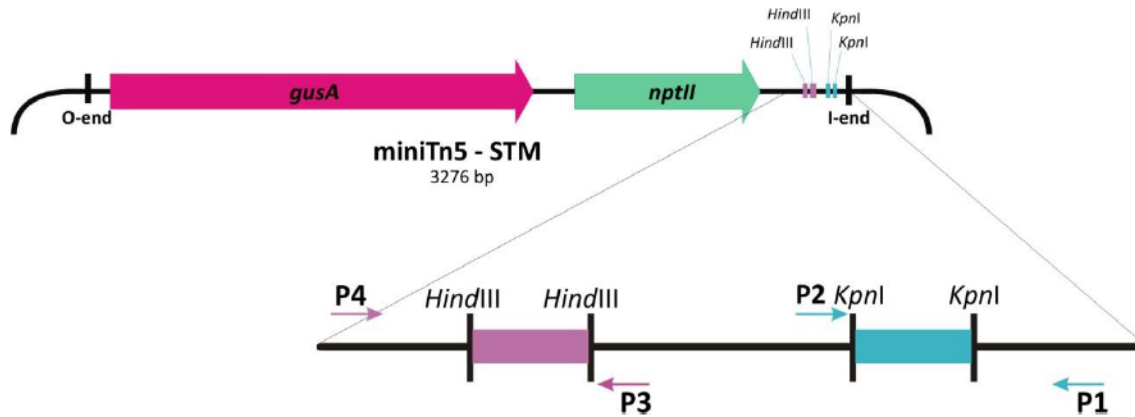


Figura IV. 3. Esquema de los miniTn5-STM construido por Pobilgaylo et al. (2006).

Las 412 firmas fueron incorporadas a los transposones como fragmentos *HindIII* (para la firma H) y fragmentos *KpnI* (para la firma K). En el presente trabajo la firma K la amplificaremos por PCR utilizando los cebadores P1 y P2; mientras que la firma H será amplificada con los cebadores P3 y P4. Ambos amplicones (P4-Firma H -P3, y P2-Firma K-P1) tienen un tamaño de 102pb (ver texto, y Materiales y Métodos, sección II.2.2 y II.4.5).

lo que nosotros hemos utilizado, otros autores han ligado adaptadores diferentes en los extremos de cada muestra (Eckert, *et al.*, 2011). Presentaremos en la sección siguiente la reacción de PCR para amplificar la región de las firmas que diferencian a cada uno de los transposones, y evidencias que muestran que la misma es capaz de amplificar una oferta de molde de al menos 10 copias de su secuencia blanco/tubo.

IV.3.4.1. Especificidad de la amplificación

Con el objetivo de ajustar las condiciones de la amplificación, y verificar la especificidad del producto obtenido, se realizaron reacciones de qPCR utilizando como molde diluciones de una preparación de ADN proveniente de un cultivo líquido generado a partir de una de las mezclas de cuatrocientos mutantes. Las curvas de fusión (“*melting*”) correspondientes a los productos de amplificación resultantes se muestra en la Figura IV.4.A, y el gel de agarosa de los mismos productos en la Figura IV.4.B. El resultado que se muestra en la figura corresponde a un par arbitrario de cebadores de la familia P3 y P4 que amplifican la firma H. Resultados similares (no se muestran) se obtuvieron con cebadores de la familia P1 y P2 que amplifican la firma K. La condiciones de ciclado, y la composición de la mezcla de reacción pueden verse en Materiales y Métodos, sección II.4.5. En la Figura IV.4.B se observa que a las concentraciones más altas de ADN se genera un producto con temperatura de fusión de aproximadamente 77°C y con movilidad electroforética en gel de agarosa que se corresponde con la de un producto de entre 100 y 200 pb. Contrastando con ese resultado, con la concentración de ADN más diluída el producto mayoritario observado tiene una temperatura de fusión mayor (aproximadamente 81°C), y posee movilidad electroforética correspondiente al tamaño esperado (de alrededor de 100 pb) para el par de cebadores usados. La mezcla heterogénea de productos de amplificación con firmas diferentes dentro de ellos (24 bases en un producto de 102 pb totales) es posible que genere al final de la PCR fragmentos de doble hebra parcialmente complementarios por hibridaciones cruzadas entre productos con firmas diferentes. Cuando la cantidad de ADN molde es muy baja, la oferta de firmas se reduce hasta unas pocas copias y el

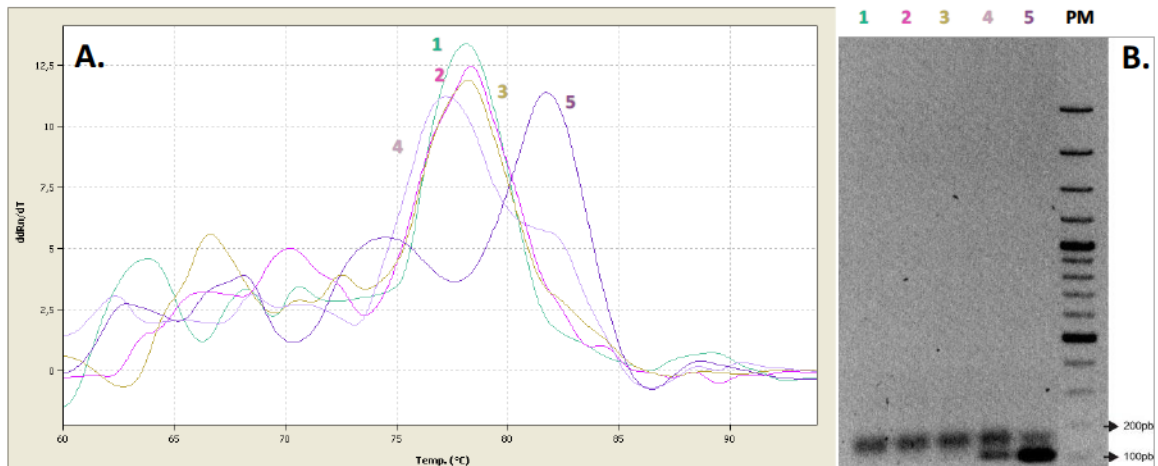


Figura IV. 4. Caracterización de los productos de amplificación obtenidos utilizando como molde diluciones seriadas de una extracción de ADN de un cultivo de rizobios generado con una de las mezclas de cuatrocientos mutantes miniTn5-STM.

A. Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos en reacciones de qPCR empleando diferentes cantidades de ADN molde: las curvas 1, 2, 3, 4 y 5 corresponden a $1,1 \times 10^5$, $1,1 \times 10^4$, $1,1 \times 10^3$, $1,1 \times 10^2$, y $1,1 \times 10^1$ copias/tubo de reacción, respectivamente. El número de copias fue estimado a partir de la DO_{260} de la preparación de ADN, y el tamaño del genoma de *S. meliloti* 2011 en pares de bases. **B.** Curvas de fusión o *melting* de los productos analizados en la parte A.

resultado de la amplificación resulta seguramente en la amplificación mayoritaria de una firma, dando un producto con movilidad electroforética menor y mayor temperatura de fusión como es esperable para un producto donde los 102 pb forman una doble cadena completa, sin una zona central de 24 pb sin apareamiento como cuando existen productos de amplificación correspondientes a múltiples firmas (concentraciones mayores de molde). Pensamos por tanto que era posible que todos los productos de amplificación fuesen correctos a pesar de sus diferencias en temperatura de fusión y movilidad electroforética. Para analizar entonces la identidad de los productos de PCR obtenidos, se realizaron los dos ensayos siguientes: a) Digestiones enzimáticas de los productos de amplificación con las enzimas *HindIII* y *KpnI*, que debieran ser internas a los fragmentos amplificados según se trate de firmas H o K, y b) Secuenciación de los productos. El resultado de estos análisis se muestra en la Figura IV. 5.

Se puede observar que el producto de amplificado con cebadores P3-P4 se digiere con *HindIII* y no se digiere con *KpnI*, y por el contrario como era esperable, el producto amplificado con cebadores P1-P2 se digiere con *KpnI* y no con *HindIII*. La secuencia obtenida para el producto obtenido con cebadores P3-P4 también confirma el resultado esperado, donde los 24 pb que no dan una secuencia única (zona central) corresponden a la posición de la firma de secuencia heterogénea en la mezcla de productos.

IV.3.4.2. Evaluación de la sensibilidad y de la eficiencia de la amplificación

Los resultados de la sección anterior muestran que las condiciones que hemos empleado en la PCR permiten amplificar diferentes firmas a partir de una mezcla heterogénea de cientos de mutantes. A partir de dicho resultado resolvimos explorar, además, el límite inferior de concentración de molde a partir del cual la PCR es capaz de llevar adelante una amplificación

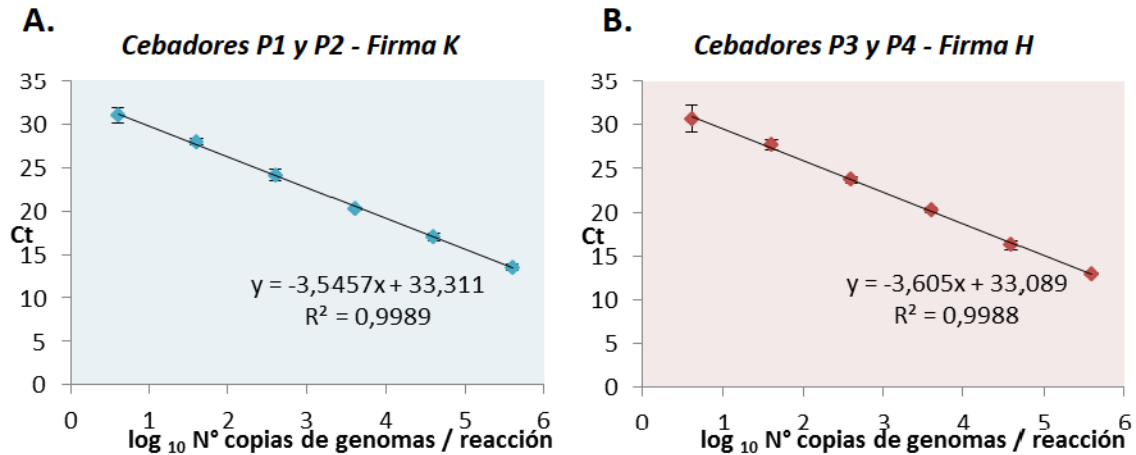


Figura IV. 6. Gráficos de Ct vs. log No en reacciones de qPCR empleando como cebadores P1-P2 (firma K) y P3-P4 (firma H).

A. Cebadores P1-P2 **B.** Cebadores P3-P4. Las rectas obtenidas representan los valores de tres reacciones independientes. Cada una de las rectas puede ser descripta por la ecuación $Ct = (1/e \times \log 2) \times \log No + (\log Nf^*/e \times \log 2)$; donde "Nf*" (constante) corresponde al número de copias mínimo detectable ("threshold") en al que se establece cada valor de Ct (ciclo de corte de la q-PCR), y "e" corresponde a la eficiencia de amplificación a lo largo de la PCR (ver texto). Los valores de "e" resultaron 0,94 y 0,92 para la amplificación de las firmas K y H, respectivamente.

La estimación de las eficiencias a partir de las pendientes de los gráficos de Ct vs log No permite obtener valores de $e = 0,94$ y $e = 0,92$ para las firmas K y H, respectivamente. Tales valores se aproximan a la eficiencia límite óptima (100%, $e=1$) para los cebadores y las secuencias blanco analizadas, indicando que en cada ciclo prácticamente todas las moléculas de molde resultan amplificadas. Si el comportamiento de la amplificación de un único tipo de firma como en las reacciones de la Figura IV.6. se conserva en las reacciones en las que incorporamos múltiples blancos de amplificación (como en las PCR de las Figuras IV.4. y IV.5.), es esperable entonces que el producto final de la PCR incorpore productos amplificados que preserven la misma representatividad de firmas que la existente en el ADN molde. Tal suposición asume que la amplificación de cada uno de los moldes en una mezcla compleja de ellos no es modificada/perturbada por la presencia y amplificación de los moldes vecinos.

IV.4. Esquema general. Consideraciones finales.

En este capítulo hemos descrito las condiciones básicas para establecer los ensayos con rizobios y plantas para el análisis de la colonización radicular mediante el uso de una técnica asistida por STM. Particularmente hemos evaluado las condiciones de inoculación, de recuperación de rizobios rizosféricos, de extracción de ADN de los mismos, y de su amplificación por PCR, hacia un análisis cuantitativo que garantice la representatividad de todos los mutantes inoculados y refleje finalmente las características de competitividad de cada uno de ellos.

Las condiciones discutidas y establecidas en esta parte del trabajo serán las utilizadas para analizar la colonización de raíces por *S. meliloti* de acuerdo al esquema general que se presenta en la Figura IV.7. Dicho esquema incluye la evaluación de la colonización de raíces de *Medicago sativa*

(alfalfa), y de *Pisum sativum* (arveja) a los 3 y a los 7 d.p.i. como modelos de colonización temprana de una raíz homóloga y una heteróloga, respectivamente. Intentaremos asimismo diferenciar entre genes asociados a las primeras etapas de abordaje a la rizósfera (población LA), de aquellos que se requieren para un anclaje más firme de las bacterias a la superficie del huésped (población FA). En todos estos ensayos evaluaremos aproximadamente seis mil mutantes independientes, atento a que estudiaremos el comportamiento de 15 mezclas de cerca de cuatrocientos mutantes cada una. Dado a) el número de genes presentes en *S. meliloti* deducidos del tamaño del genoma y la información actual disponible (entre 6.000 y 7.000 considerando los asociados a productos polipeptídicos, rRNAs, tRNAs, y sRNAs), b) que varios de ellos son esenciales y por tanto letal su alteración, y c) la baja preferencia de sitios de transposición del Tn5, la posibilidad de evaluar cerca de seis mil mutantes parece razonable para efectuar la búsqueda de genes asociados al ingreso rizosférico.

La metodologías de análisis por las que hemos optado para caracterizar la colonización radicular temprana (STM, amplificaciones por PCR, secuenciamiento paralelo de segunda generación y conteo bioinformático de firmas) han sido elegidas y combinadas teniendo en cuenta las características del problema a estudiar, la factibilidad de aplicación del procedimiento al número de condiciones que se deseaban analizar, el costo de las diferentes etapas, y la posibilidad de contar con mutantes en cada uno de los genes que pudieran identificarse.

El progreso en las plataformas de secuenciamiento masivo paralelo ha permitido en los últimos años diseñar nuevas alternativas metodológicas para estudios funcionales, lo que ha permitido el nacimiento de técnicas alternativas al STM, como son TraDIS o Tnseq (van Opijnen & Camilli, 2013). El uso alternativo de TraDis (ver Introducción de esta tesis, sección I.3.2), que hace uso de la región de unión transposón-genoma como firma identificatoria de cada inserción, y evita el etiquetado de transposones con firmas (como en el caso de STM) y el uso de mezclas, hubiese sin embargo incorporado una serie de inconvenientes que son inherentes a la propia técnica. En primer lugar, usado TraDIS no podríamos emplear –como ventaja– mezclas con miles o decenas de miles de mutantes en simultáneo (a pesar de que la metodología lo permite), dado que, como hemos discutido largamente en este capítulo, inoculando bajos números de rizobios no se hubiera logrado una adecuada representación (en números absolutos) de cada uno de los mutantes agregados a la raíces. En segundo lugar, si bien la identificación de la región genómica para cada mutante alterado en colonización hubiese sido accesible a partir del secuenciamiento, el aislamiento de los correspondientes mutantes para su estudio posterior hubiera resultado un trabajo significativo adicional particularmente pensando en que pueden reconocerse varias decenas de genes asociados a la colonización radicular.

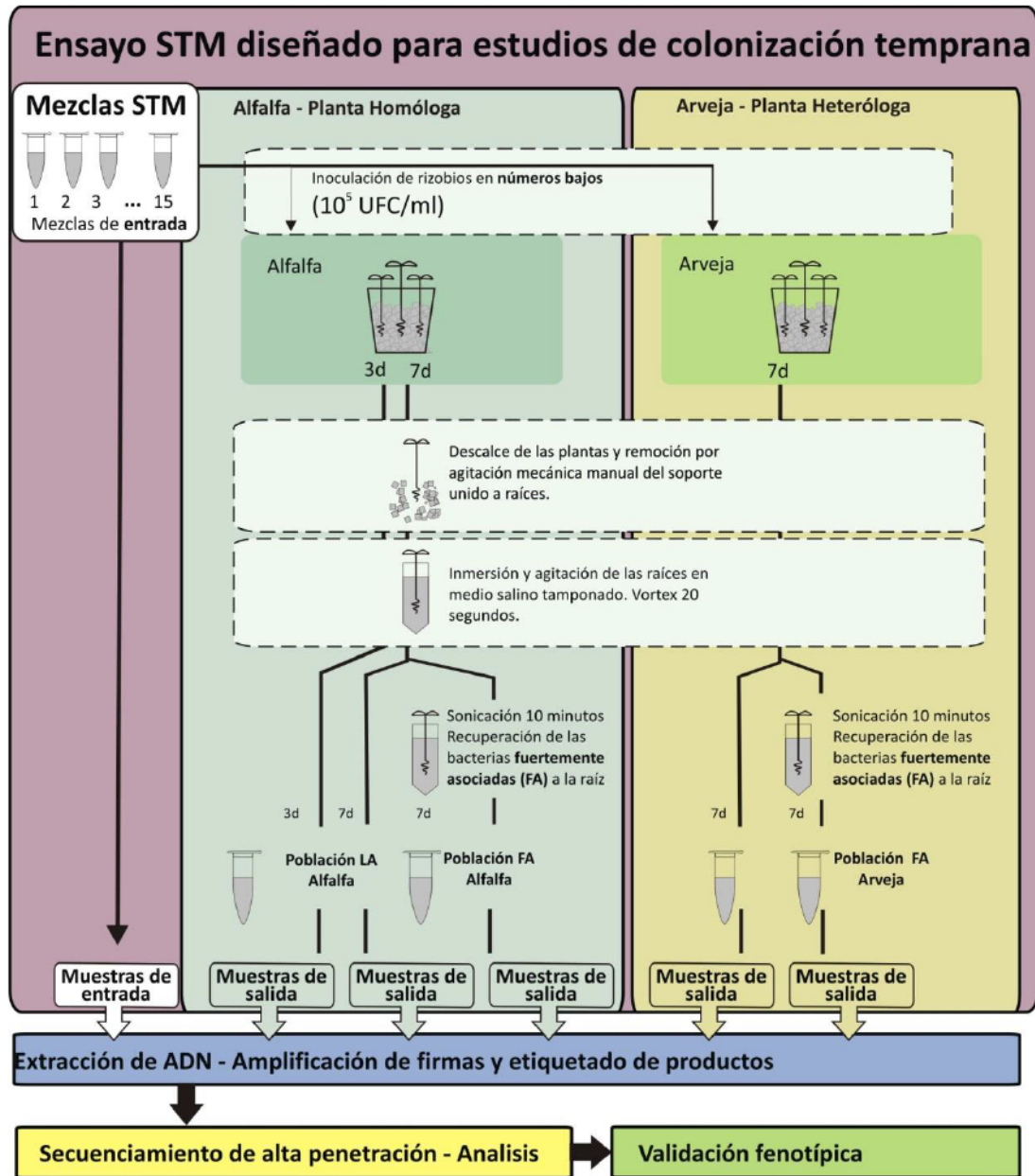


Figura IV. 7. Esquema general del diseño de los ensayos asistidos por STM para el estudio de la colonización temprana de raíces homólogas y heterólogas por el rizobio modelo *S. meliloti*.

En los capítulos siguientes se describirán los ensayos, la estrategia de secuenciación utilizada, las herramientas bioinformáticas desarrolladas para la minería de datos (recuadro amarillo en la figura), y la validación fenotípica final de cada uno de los mutantes seleccionados frente a la cepa salvaje en ensayos individuales de colonización (recuadro verde).

Al inicio de este trabajo analizamos las ventajas y desventajas de las diferentes aproximaciones posible para estudios rizosféricos, y decidimos el uso preferencial de STM principalmente por dos razones. En primer lugar disponíamos de una biblioteca construida previamente en la bacteria y la cepa que siempre hemos empleado en nuestro laboratorio, de la que además se dispone el genoma secuenciado completo (Sallet, *et al.*, 2013). Además, como ya hemos mencionado, para más de la mitad de los mutantes el sitio de inserción de los transposones es conocido, y los mutantes correspondientes han sido preservados aislados y están disponibles

(laboratorio de la Dra. Anke Becker). En tales circunstancias, detectando las firmas cuyas mutaciones generan deficiencias en la colonización se dispone inmediatamente de la identidad de los genes involucrados y de los mutantes correspondientes para ensayos con plantas. De todos modos, si bien en los estudios previos de Pobigaylo (2006, 2008) se han usado microarreglos para el conteo de firmas; para el número de condiciones, mezclas y réplicas de nuestro ensayo su uso resultó inaplicable. Las hibridaciones son metodológica y técnicamente laboriosas, y con mayor costo y error que la secuenciación con tecnologías de última generación. A modo de ejemplo, para estudiar dos mezclas de mutantes (en total 756 mutantes) en una única condición Pobigaylo et al. utilizaron 16 microarreglos doble canal (4 réplicas por cada condición de hibridación para cada firma). El ensayo que hemos planteado en este capítulo involucra el desafío de 15 mezclas de mutantes en 5 condiciones cada una (alfalfa 3 d.p.i., alfalfa 7 d.p.i. LA, alfalfa 7 d.p.i. FA, arveja 7 d.p.i. LA y arveja 7 d.p.i. FA). El análisis de esta cantidad de muestras utilizando hibridación requeriría la realización de al menos 600 microarreglos ($15 \text{ mezclas} \times 5 \text{ condiciones} \times 4 \text{ réplicas biológicas} \times 2 \text{ firmas} = 600$). Es por estas consideraciones que hemos escogido como método de cuantificación de firmas la secuenciación, previa amplificación y marcaje de las firmas por PCR mediante uso de cebadores con diferentes extremos 5' según hemos descrito en la sección IV.3.4 de este capítulo. Como se describirá en los próximos capítulos, hemos utilizado la metodología de microarreglos por marcaje de sondas con fluorescencia sólo para validar la nueva metodología de STM-secuenciamiento que utilizamos en esta tesis, analizando una única mezcla de mutantes en una sola condición.

Capítulo V

Aproximación experimental STM clásica mediante el uso de microarreglos de ADN, aplicada a la búsqueda de mutantes de *S. meliloti* afectados en la colonización radicular.

V.1. Introducción

En el capítulo anterior hemos discutido un nuevo enfoque metodológico para la búsqueda de marcadores genéticos del *S. meliloti* que impacten fenotípicamente en la colonización temprana, basado en el uso de mutantes etiquetados por firmas. A partir de la biblioteca construida por Pobilgaylo et al. (Pobilgaylo, *et al.*, 2006), hemos discutido y evaluado las condiciones de inoculación, de desafío, de recuperación de rizobios de la raíz, y el procesamiento de las muestras de salida. En las secciones siguientes utilizaremos las condiciones experimentales propuestas para el desafío de una única mezcla de cuatrocientos mutantes y en una única condición (colonización de raíces de alfalfa evaluada a los 3 d.p.i.), realizando recuento de firmas en microarreglos como ha sido utilizada hasta el momento en rizobios. El ensayo nos permitirá evaluar si el diseño experimental presentado en el capítulo anterior es adecuado para acceder a los marcadores asociados a la colonización temprana, previo al uso extendido del mismo (más mezclas y mutantes) con el sólo cambio en la metodología para el recuento de firmas.

V.2. STM aplicada al estudio de 412 mutantes en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i.

V.2.1. Desafío. Preparación de muestras de entrada y salida.

La Figura V.1. muestra un diagrama del esquema experimental utilizado para el estudio de la mezcla N° 1 de mutantes. A partir de un cultivo en fase logarítmica, crecido durante pocas generaciones (no más de cuatro), se preparó el inóculo inicial de aproximadamente 10^5 u.f.c./ml en medio mineral Fåhreaus (ver capítulo IV precedente). Téngase en cuenta que la mezcla de 412 mutantes fue generada por combinación de números comparables de cada uno de los mutantes, razón por la cual el crecimiento líquido inicial del inóculo se realizó por una pocas generaciones a fin de minimizar la sub/sobre-representación en el inóculo de aquellos mutantes que tengan diferente velocidad de crecimiento en el medio TY (ver Materiales y métodos sección II.4.2). Aunque la cuantificación de la proporción de cada mutante en el inóculo (mezcla de entrada) se hará de todos modos por microarreglos/secuenciamiento, la idea es introducir a las raíces –en lo posible– cantidades comparables de cada uno de los mutantes. Dado que el inóculo en medio Fåhreaus es sólo una dilución del cultivo en TY, dicho cultivo inicial se guardó como muestra de entrada. El inóculo diluido en solución mineral fue utilizado para inundar cuatro macetas (cuatro replicas biológicas) con vermiculita estéril, donde se colocaron entre 10 y 12 semillas de alfalfa previamente germinadas en agar agua (ver Materiales y Métodos sección II.3.1 y II.4.2.). Tres días después de la inoculación las plantas se retiraron de la maceta y se sumergieron en 5 ml de medio Fåhreaus estéril. Tal como describimos en el capítulo anterior las plantas se agitaron por tratamiento con vórtex durante 20 segundos para extraer la población de rizobios que hemos definido como LA. Esta suspensión de bacterias constituyó la mezcla de salida. Las mezclas de entrada y de salida se preservaron a -80°C (sección II.4.3) y fueron luego procesadas simultáneamente para extraer su ADN según el procedimiento descrito en Materiales y Métodos (sección II.4.4) evaluado en el capítulo IV previo.

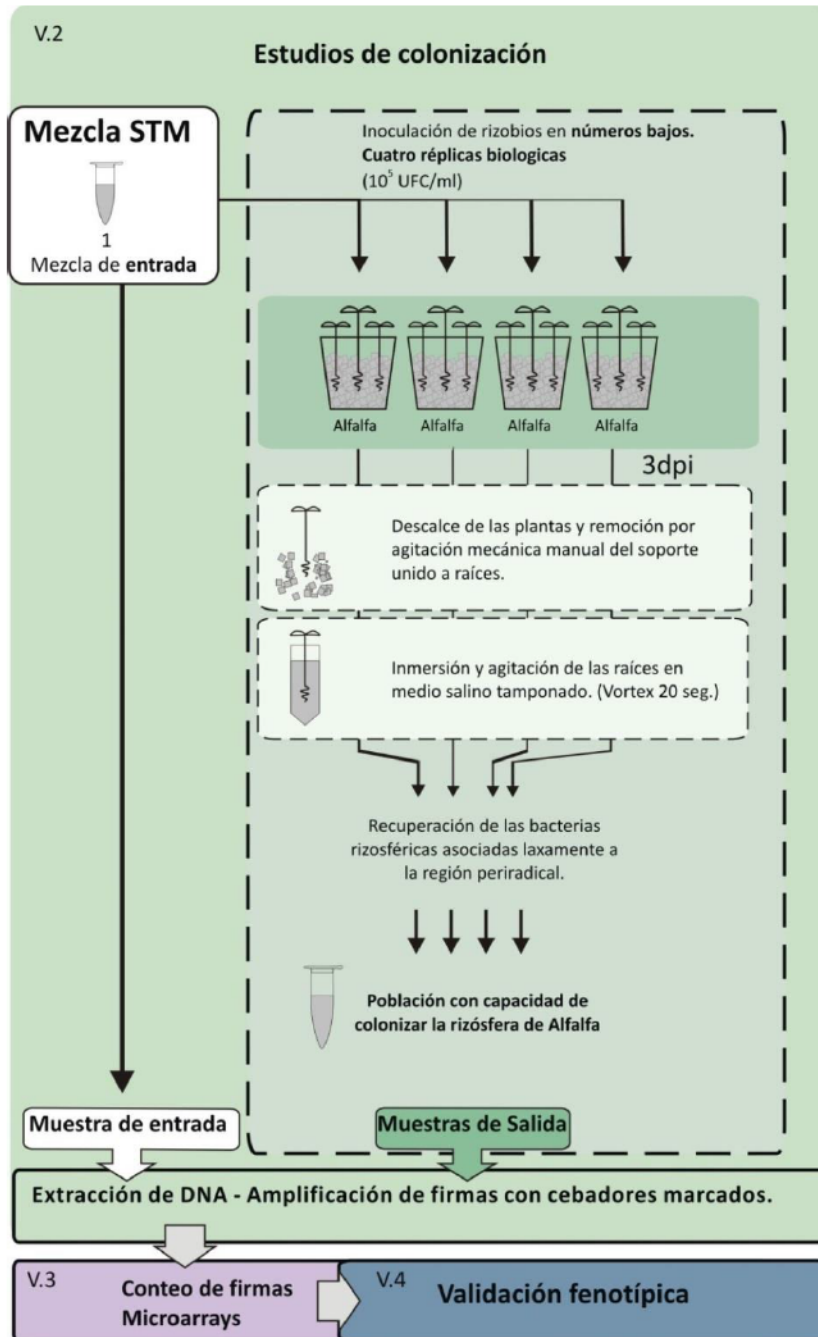


Figura V. 1. Esquema experimental del ensayo realizado para el estudio de la mezcla N° 1 de mutantes en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i.

Un cultivo de la mezcla N°1 de mutantes fue diluido a una concentración final de 1×10^5 u.f.c./ml en medio mineral Fåhræus y utilizado para inocular por inundación cuatro macetas con vermiculita estéril (cuatro réplicas). En cada maceta se colocaron entre 10 y 12 semillas de alfalfa previamente germinadas. Tres días después las plantas fueron tratadas para obtener la población asociada laxamente a la rizósfera. Las mezclas de entrada y salida fueron procesadas para extraer su ADN total y las firmas fueron amplificadas por PCR con oligonucleótidos marcados (ver texto). Cada producto de amplificación fue hibridado en arreglos mTn5-STM (Pobigaylo, *et al.*, 2006). El procesamiento de los datos arrojados por los arreglos se describe con detalle en el texto materiales y métodos (sección II.4.8).

V.2.2. Evaluación del cambio en la proporción de firmas de la mezcla final con respecto a la mezcla inicial.

Como hemos mencionado previamente, cualquiera sea el método que se utilice para evaluar el cambio en la proporción de mutantes, se requerirá un paso de amplificación de firmas para: a) aumentar la cantidad manteniendo la proporción entre cada una de ellas, y b) [sólo si se hará recuento por secuenciamiento] dar lugar al marcado molecular de los productos de modo que en un experimento en el cual se utilicen varias mezclas y se analicen diferentes condiciones con sus réplicas, se pueda distinguir de cuál mezcla se trata, de qué condición, y finalmente de qué réplica. Así, para el ensayo en microarreglos, a partir del ADN genómico proveniente de la muestra de entrada (mezcla de mutantes N°1) se realizaron cuatro amplificaciones independientes de las firmas

H y K por PCR (**replicas técnicas**) utilizando oligonucleótidos modificados marcados en su extremo 5' con el marcador fluorescente Cy3. El procedimiento se repitió con los mismos oligonucleótidos modificados para el ADN proveniente de cada una de las cuatro macetas de las **muestras de salida (réplicas biológicas)**. Finalmente, siguiendo el protocolo descrito en la sección II.4.8 de Materiales y Métodos, se realizaron hibridaciones por separado de cada amplificación utilizando el microarreglo miniTn5-STM1 en el que se hallan impresas todas las firmas H y K de los miniTn5 (Pobigaylo, *et al.*, 2006). En total, se realizaron 16 hibridaciones en arreglos de canal único (para cada firma H y K, 4 para la mezcla de entrada y 4 para la mezcla de salida).

V.2.3. Análisis de datos provenientes de las hibridaciones.

Las imágenes provenientes de todos los arreglos fueron procesadas de igual manera para obtener de cada posición un valor de intensidad (ver sección II.4.8). El **valor de intensidad de cada posición fue normalizado por la suma total de intensidades en todo el arreglo**. Los datos fueron analizados para obtener de cada vidrio un valor promedio de fluorescencia de todas las posiciones (réplicas) de una misma firma. A su vez, los valores obtenidos para los vidrios de cada una de las cuatro réplicas técnicas/biológicas fueron promediados. Los valores así obtenidos fueron llamados $%I_E$ e $%I_S$ en referencia a las proporciones de intensidades de entrada y de salida, respectivamente. De esta manera, para cada una de las firmas K y H quedó definido un único valor de $%I_E$ e $%I_S$. La comparación de estos valores se realizó utilizando dos parámetros conocidos como **valor A** y **valor M**:

$$A = \frac{1}{2} \log_2 (%I_S \times %I_E)$$

$$M = \log_2 (%I_S / %I_E)$$

El valor A corresponde al promedio geométrico logarítmico en base 2 de las intensidades de salida y entrada de una firma dada (intensidad media). El valor M corresponde al logaritmo en base 2 de la razón de cambio entre las intensidades de salida y entrada de una firma dada (intensidad relativa). Un valor de M cercano a cero para una firma determinada, significará que no hay diferencia entre las intensidades de esa firma en la mezcla de entrada y salida; un valor de $M = -1$ será indicativo del doble de intensidad en la mezcla de entrada respecto a la mezcla de salida (mutante afectado negativamente en esa condición), y viceversa para un $M = 1$ (mutante afectado positivamente). La gráfica de distribución de valores M en función de los valores de A (Gráfica MA) obtenida a partir de los arreglos realizados se muestra en la Figura V.2. Como puede observarse, la utilización de un único fluoróforo y la normalización de cada intensidad por la intensidad total en ese arreglo permitieron obtener una distribución de la nube de puntos alrededor del cero, que nos permitió continuar con el análisis sin la necesidad de utilizar pasos adicionales de normalización. Finalmente, para cada una de las firmas se realizó una *prueba t* (Student) para evaluar si los datos de intensidades eran o no significativamente diferentes. Así, definimos como mutantes afectados

negativamente a aquellos que presentaron valores $M < -0,7$ y un $p < 0,1$, tanto en la firma K como en la firma H (exigencia de consistencia en el resultado observado desde ambas firmas).

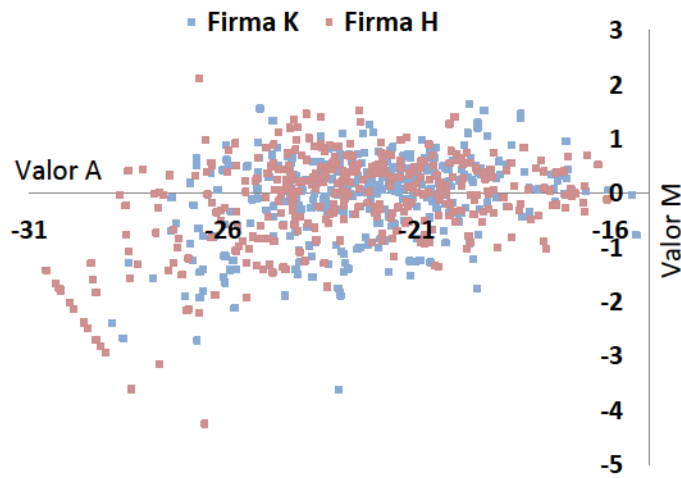


Figura V. 2. Gráfica MA obtenida a partir de los arreglos realizados para el análisis de mutantes alterados en la colonización de plantas de alfalfa 3dpi.

Distribución de los “valores M” en función de los “valores A” obtenidos a partir de los arreglos realizados para las muestras de entrada y salida de la mezcla de mutantes N° 1 en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i.. Los datos obtenidos fueron tratados como se indica en el texto. En azul se encuentran los valores obtenidos para la firma K y en rosa los mismos para firma H.

La lista de mutantes afectados negativamente en la colonización de raíces de plantas de alfalfa 3 d.p.i. quedó conformada por doce mutantes que se listan en la Tabla V.1.

Tabla V. 1. Lista de mutantes de *S. meliloti* afectados negativamente en la colonización de raíces de alfalfa a los 3 d.p.i. de acuerdo al análisis de firmas realizado en microarreglos.

Firma	Valor M_{prom}	Región/Gen	Función
122	-3,61	intergénico	inserción 30 pb río arriba del gen <i>metZ</i> (O-succinil homoserina sulfhidrilasa)
216	-2,80	SMc03797	<i>metA</i> - homoserina O-succinil transferasa
276	-2,06	SMc04245	<i>znuA</i> – componente periplasmático del transportador de zinc de alta afinidad del tipo ABC
358	-1,87	SMc03021	<i>fliM</i> - proteína transmembrana interruptor del motor flagelar
305	-1,84	SMc02407	Proteína Hipotética (HP)
98	-1,58	SMc00618	<i>ppk</i> - polifosfato quinasa
411	-1,56	NS	Inserción no secuenciada
229	-1,48	SMc03089	Proteína Hipotética
206	-1,34	SMc01977	probable proteína transportadora del tipo ABC
188	-1,15	SMc03021	<i>fliM</i> - proteína transmembrana interruptor del motor flagelar
85	-1,15	Smb20723	Probable transportador de hierro del tipo ABC
436	-1,07	SMc00114	proteasa II. Oligopeptidasa B

Los valores de la primera columna corresponden al número de cada una de las firmas presente en los mutantes afectados de la Mezcla N° 1. El valor M_{prom} corresponde al promedio de los valores de M obtenidos para cada una de las dos firmas (K y H). La inserción del mini-Tn5 del mutante que lleva las firmas H y K N° 411 no ha sido aún mapeada en el genoma de *S. meliloti* 2011.

Utilizando los mismos criterios mencionados anteriormente ($M > 0,7$ y valor $p < 0,1$), seleccionamos aquellos mutantes que se encontraron sobre-representados en la mezcla de salida (afectados positivamente). Los seis mutantes que aumentaron su representatividad en experimentos de colonización de raíces de plantas de alfalfa 3 d.p.i. se listan en la Tabla V.2.

Tabla V. 2. Lista de mutantes de *S. meliloti* afectados positivamente en la colonización de raíces de alfalfa a los 3 d.p.i. de acuerdo al análisis de firmas realizado en microarreglos.

Firma	Valor M_{prom}	Región/Gen	Función
161	1,39	SMb20925	Proteína hipotética de membrana
211	1,36	SMb20763	phnK - proteína de unión a ATP
259	1,34	AL591688	Unidad repetitiva AL591688
466	1,08	SMb21155	Proteína Hipotética
478	0,84	SMb21584	Proteína hipotética
10	0,86	SMb21435	alantoato amidohidrolasa

Los valores de la primera columna corresponden al número de cada una de las firmas presente en los mutantes afectados de la Mezcla N° 1. El valor M_{prom} corresponde al promedio de los valores de M obtenidos para cada una de las dos firmas (K y H).

V.3. Inspección de los genes afectados. Ensayos de validación.

Con el objetivo de evaluar si los mutantes de la Tabla V.1 identificados por STM están efectivamente afectados en su capacidad de colonización, estudiamos el comportamiento de algunos de ellos en experimentos de co-inoculación con el rizobio isogénico salvaje (ver materiales y métodos sección II.4.9). Para dichos ensayos elegimos los cinco primeros mutantes de la Tabla V.1 (rango de valores de M desde $-3,61$ a $-1,84$) y el mutante que lleva la firma 211, encontrado como afectado positivamente ($M = 1,36$). Todos ellos fueron inoculados por separado, y junto a la cepa *S. meliloti* MP6 (*S. meliloti* 2011-*gfp*, Tc^R) como indicadora interna del comportamiento salvaje. Por otra parte analizamos las propiedades de crecimiento de los mismos cinco mutantes en medio rico y en medio mínimo de modo de conocer si existen cambios en los tiempos de generación de los mutantes cuando los mismos son crecidos bajo condiciones nutricionales diferentes. Los resultados de los ensayos anteriores se presentan a continuación.

metA – *metZ* :

En la tabla V.1 puede observarse que los dos mutantes que se encontraron más afectados (M más negativos) están alterados en genes asociados a la biosíntesis de metionina (firmas 122 y 216). La biosíntesis de metionina en *S. meliloti* se produce a partir del intermediario O-succinil-homoserina producido por la enzima homoserina O-succinil transferasa (*MetA*). Este intermediario puede ser también convertido en L-homocisteína por la catálisis directa de *MetZ* o a través de las enzimas *MetB* y *MetC* (Dunn, 2014). El *screening* de dos mezclas de mutantes en condiciones de competición por la formación de nódulos realizado por Pobilgaylo et al. (2008) también permitió identificar este mutante *metA* como afectado negativamente en esa condición. El desafío individual del mutante *metA* con la bacteria salvaje demostró que dicho mutante se encuentra muy afectado en la competición por la nodulación sólo encontrándose presente en el 0,04% de los nódulos. Sin

embargo, en ensayos de nodulación de simple inoculación (no competición), el mutante demostró capacidad de producir nódulos efectivos. La Figura V.3. muestra el crecimiento de los mutantes *metA* y *metZ* en medio TY y en medio Evans donde puede observarse que ambos rizobios están afectados en su crecimiento en medio mínimo. En los ensayos de evaluación de la colonización radicular en co-inoculación con la cepa salvaje observamos que ambos mutantes están en efecto tempranamente afectados en la interacción con la planta, con deficiencias más marcadas para el caso del mutante *metA*. Deberá evaluarse si los cambios en la simbiosis están asociadas a deficiencias en síntesis endógena de metionina o de homocisteína. Cualquiera sea el caso, los fenotipos de los mutantes *met* puestos en evidencia a través del experimento de STM, resultaron validados en los ensayos de colonización evaluados por plaqueo directo de los dos rizobios co-inoculados (mutantes y cepa salvaje).

znuA

El gen *znuA* codifica una proteína periplasmática de unión al zinc, que junto con los productos de los genes *znuBC* (permeasa y ATP-asa, respectivamente) de la misma unidad transcripcional forman un transportador de zinc de alta afinidad (Vahling-Armstrong, *et al.*, 2012). Mutantes en el gen *znuA* de *Pasteurella multocida* (Garrido, *et al.*, 2003), *Haemophilus ducreyi* (Lewis, *et al.*, 1999), *Brucella abortus* (Yang, *et al.*, 2006) y *Salmonella enterica* (Ammendola, *et al.*, 2007) han demostrado virulencia atenuada en modelos animales. Los autores de estos trabajos atribuyen el fenotipo atenuado a que la concentración de zinc en los tejidos del hospedador es muy baja, y la pérdida del transportador tiene un efecto directo sobre la proliferación del patógeno. Las curvas de crecimiento del mutante *znuA* de *S. meliloti* muestran que el mismo no se encuentra afectado en su crecimiento en medio TY, y tampoco en medio mínimo Evans (concentración de $Zn^{2+} = 25 \mu M$). El mutante en el gen *znuA*, sin embargo, resultó afectado en la competición por la colonización de plantas de alfalfa a los 3 d.p.i. confirmando el hallazgo fenotípico por STM. Por otra parte, los resultados sugieren que la disponibilidad intracelular de Zn^{2+} es posiblemente un factor limitante importante durante el abordaje rizosférico por parte de los rizobios.

fliM

Dos de los doce mutantes que demostraron fenotipo atenuado en colonización, presentan inserciones en el gen *Smc03021*. El gen *Smc03021* o *fliM*, codifica una proteína transmembrana interruptor del motor flagelar y se encuentra en un operón junto con *fliG*, *fliN* y *motA* (*Smc03019*, *Smc03020* y *Smc03022*). Las mutaciones en este gen seguramente (no ha sido confirmado) tienen un efecto polar sobre la transcripción de *fliN* y *fliG*. Estos genes codifican tres proteínas que constituyen el interruptor que controla la dirección de la rotación flagelar. Este interruptor recibe las señales del ambiente (probablemente a través de CheY) y responde dirigiendo el sentido de rotación del flagelo (Sourjik & Schmitt, 1996, Armitage & Schmitt, 1997). Como es esperable, el crecimiento de este mutante no se encontró afectado en ninguno de los dos medios de crecimiento ensayados (Figura V.3.). Los defectos en colonización radicular temprana evidenciados por STM fueron confirmados en los ensayos de doble inoculación con rizobio salvaje (Figura V.4).

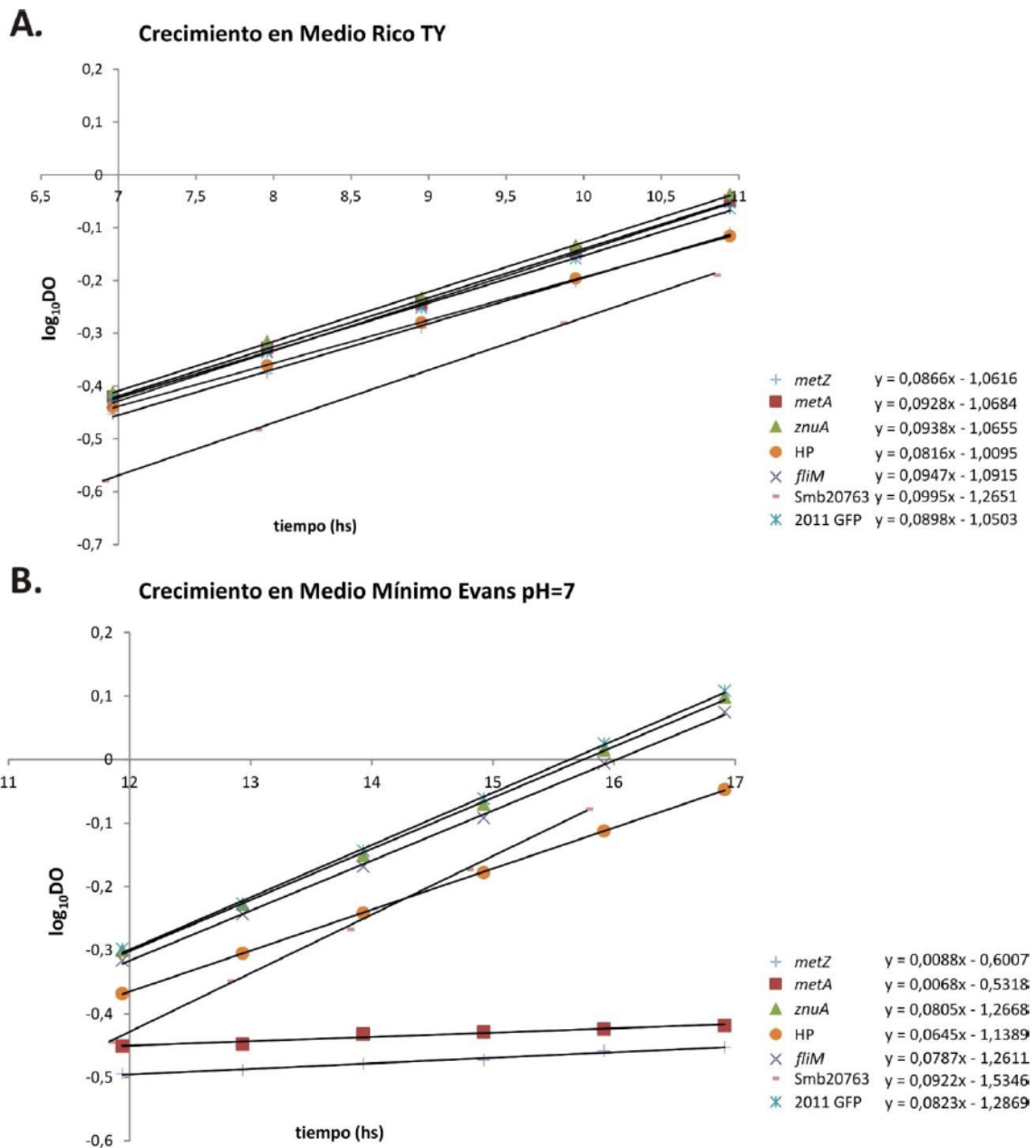


Figura V. 3. Crecimiento in vitro en medios rico y mínimo de mutantes afectados negativamente en la colonización de raíces.

A. Crecimiento de los mutantes en medio rico TY. B. Crecimiento de los mutantes en medio mínimo Evans. Las curvas de crecimiento de los rizobios fueron realizadas a 28°C y 180 r.p.m. por seguimiento de la DO de los cultivos a 600 nm según se indica en Materiales y Métodos sección II.1.1. Las gráficas muestran, en escala semi-logarítmica, la fase de crecimiento exponencial (ecuaciones a la derecha, $y = \log_{10} DO$, $x = \text{tiempo en h}$). Como control se analizó el comportamiento de cepa salvaje isogénica *S. meliloti* 2011. HP: Proteína hipotética interrumpida por el mini-Tn5 en el mutante Smb02407, ver Tabla V.1.

Smc02407

El gen *Smc02407* se encuentra anotado como codificante de una proteína hipotética, conservada, y de función desconocida. Si bien no hay estudios previos que describan fenotipos asociados a la función de este gen, análisis de RNAseq en *S. meliloti* bajo 16 condiciones distintas de crecimiento y estrés ha permitido identificar más de 10 sitios de inicio de la transcripción (TSS) para este ORF (<https://gendb.cebitec.uni-bielefeld.de/cgi-bin/login.cgi>, región: *Smc02407* (Schlüter, *et al.*, 2013)).

Habrá que atender si el gen afectado tiene influencia sobre la funcionalidad del gen *Smc02406* localizado inmediatamente río abajo, dado que el producto traducido de este último incluye dominios vinculados a adhesinas y sistemas de secreción tipo V. El crecimiento de este mutante en los medios de cultivos utilizados no demostró diferencias en comparación con la bacteria salvaje (Figura V.3). Como en todos los casos anteriores, el fenotipo defectivo en colonización evidenciado por STM pudo ser validado (Figura V.4).

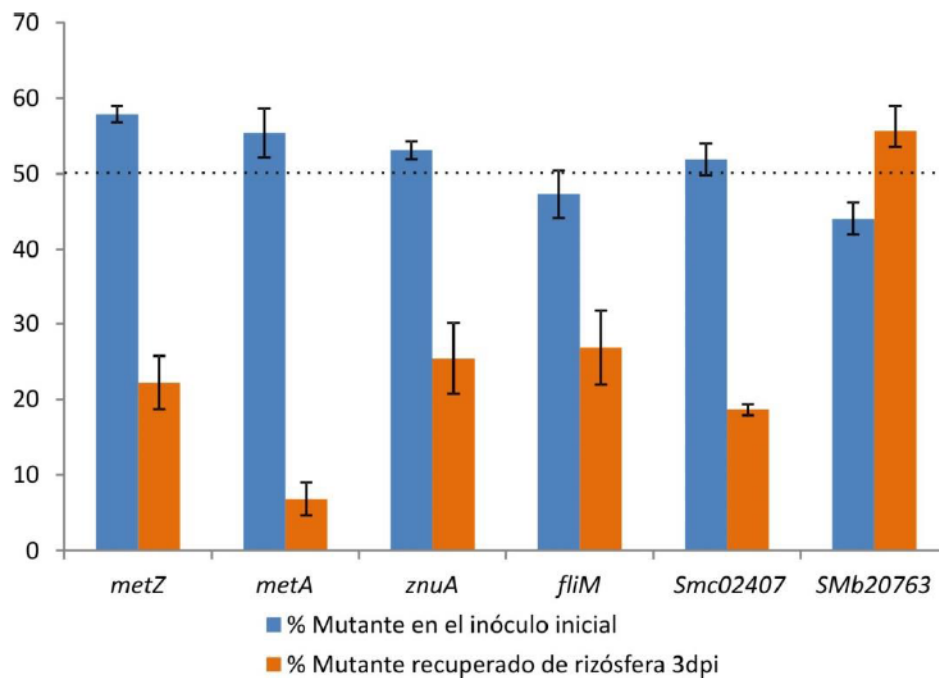


Figura V. 4. Experimentos de colonización de raíces de *M. sativa* (alfalfa) co-inoculadas con mutantes seleccionados como afectados en colonización por STM, y con la cepa salvaje *S. meliloti* 2011-GFP.

A partir de un inóculo inicial conformado por la mezcla de bacterias mutantes y salvajes en la proporción indicada (barra azul), se analizó la proporción de mutantes extraídos de la rizósfera (población LA, ver capítulo IV precedente) a los 3 d.p.i. (barra ocre). Los resultados corresponden al promedio de tres réplicas biológicas. Las barras de error representan el error estándar.

Smb20763

El gen *Smb20763* codifica una proteína de unión a ATP posiblemente involucrada en el transporte de fosfonato. Recientemente se lo ha identificado como un transcripto regulado por el ciclo celular (De Nisco, *et al.*, 2014). El mutante en este gen demostró encontrarse afectado positivamente según el análisis de arreglos, presentando un valor $M_{prom}=1,36$. El análisis del crecimiento del mutante *Smb20763* en los medios de cultivo TY y Evans, nos permitió observar diferencias positivas en el crecimiento del mutante respecto a la cepa salvaje (Figura V.3). Estas diferencias no representan más del 5% en la velocidad de crecimiento, sin embargo no podemos descartar que las mismas se relacionen con el comportamiento diferencial del mutante en la rizósfera de alfalfa. En experimentos de co-inoculación este mutante demostró aumentar un 20% su representatividad después del desafío (Figura V.4).

En el presente capítulo hemos evaluado las condiciones experimentales ajustadas en el capítulo precedente, y demostramos que las mismas son adecuadas para estudiar la colonización temprana de raíces por rizobios. El ensayo piloto que hemos presentado fue realizado con una única mezcla de cuatrocientos mutantes, empleando la tecnología clásica de microarreglos para el análisis cuantitativo de las firmas de cada mutante. El análisis de los arreglos nos permitió identificar 12 mutantes que de acuerdo al experimento de STM disminuyeron su representatividad en la mezcla de salida en al menos un factor 2 (a la mitad) ($M \leq -1$), y 6 mutantes que aumentaron su representatividad en el menos el doble ($M \geq 1$), tanto para la firma K como para la firma H (diferencias significativas para ambas firmas al nivel $p \leq 0,1$).

La evaluación de seis de los mutantes potencialmente afectados en colonización en ensayos de co-inoculación en bajos números con la cepa *S. meliloti* 2011 (indicadora del comportamiento salvaje), y recuento directo por plaqueo de los rizobios colonizadores; permitió confirmar la selección hecha por STM validando la aproximación metodológica utilizada. La lista de mutantes afectados negativamente incluyó dos mutantes independientes que llevan la inserción del minitransposón en el mismo gen (*fliM*, Tabla V.1). Tal redundancia en el proceso de selección entre cuatrocientos mutantes diferentes provee evidencia fuerte respecto del rol del gen afectado, y de la validez de las condiciones ensayadas.

El análisis de los resultados obtenidos a partir de las hibridaciones mostró una **distribución de valores de M alrededor del cero** (Figura V.2.) lo que sugirió, como era esperable, que la mayoría de los mutantes estuvieron efectivamente representados en el ensayo y que sólo unas pocas expresan cambios marcados en su capacidad colonizadora de raíces. **Se observa además que los afectados negativamente son más numerosos, y que, en módulo, presentan valores mayores de M.**

Los resultados de la mezcla que analizamos indicaron que, con las líneas de corte utilizadas (valores de $M \leq -0,7$ y $M \geq 0,7$), aproximadamente el 3% de los mutantes muestran deficiencias en la capacidad de colonización. Los análisis de secuencias y comparaciones con ortólogos mostraron entre los marcadores afectados a genes asociados a la síntesis de componentes esenciales

(aminoácidos en este caso como *metA* y *metZ*), componentes de transportadores de membrana (metales; como *znuA* posiblemente Zn^{2+} , y *Smb20723* posiblemente hierro), componentes del aparato locomotor (quimiotaxis en particular como *fliM*), una quinasa (*SMc00618*), una proteasa (*SMc00114*), y genes de función aún desconocida (*SMc02407*, *SMc03089*). Ninguno de los cinco mutantes caracterizados mostró significativamente afectada su velocidad de crecimiento en medio rico. Dos de ellos, los mutantes *met* como era esperable, mostraron cambio en el crecimiento en medio mínimo Evans. No hemos evaluado aún el comportamiento del mutante *znuA* en medio Evans con cantidades limitantes de Zn^{2+} , ni realizado experimentos de colonización radicular en presencia de cantidades micromolares de dicho ion en el medio de plantas de *Fåhraeus* a fin de establecer si el mismo es limitante en el entorno rizosférico.

En el capítulo siguiente abordaremos el ensayo diagramado en la Figura IV.7 del capítulo precedente extendiendo el análisis a cerca de 6000 mutantes, evaluando diferentes condiciones de colonización (tiempos, población laxa y firmemente asociada a la raíz, plantas diferentes) mediante el empleo de secuenciamiento paralelo para la evaluación del cambio en la proporción de firmas en las mezclas de entrada y salida.

Capítulo VI

Evaluación simultánea de millares de mutantes en su capacidad de colonizar raíces, utilizando STM acoplada a secuenciación masiva de alta penetración. Validación y contrastación con el uso de microarreglos.

VI.1 Introducción.

Los resultados de validación obtenidos en el capítulo V han demostrado que el ensayo STM diseñado para evaluar fenotípicamente el comportamiento de mezclas de mutantes en condiciones de colonización temprana permite obtener la información biológica buscada. Sin embargo, y según hemos comentado anteriormente, el uso de hibridación para evaluar los cambios en la proporción de firmas se vuelve impracticable cuando lo que se busca es analizar un gran número de mezclas. En este capítulo describiremos el uso de un nuevo método para la evaluación de proporción de firmas basado en secuenciamiento de alta penetración, aplicado al análisis de la colonización de raíces homólogas (y heterólogas en el capítulo VII siguiente) según propusimos en el esquema experimental que presentamos en la Figura IV.7.

VI.2 Utilización de plataformas de secuenciamiento de alta penetración para el conteo de firmas en ensayos STM. Consideraciones generales.

El desarrollo, particularmente intensificado en los últimos 10 años, de las denominadas plataformas de secuenciamiento paralelo de alta penetración [también referidas como *Next (second and third)-generation-sequencing* NGS]; ha permitido un avance en órdenes de magnitud en la capacidad de procesamiento a costos por base cada vez más reducidos (en los equipos más recientes Tb/corrida, con miles de millones de lecturas paralelas). La gran cantidad de lecturas que pueden obtenerse con estas nuevas tecnologías, convierten al secuenciamiento en una herramienta que, además de ofrecer gran cantidad de información de secuencias desconocidas, es capaz de detectar cambios cuantitativos en la cantidad de veces que una secuencia determinada se encuentra en una mezcla, es decir, pueden ser utilizadas para contar moléculas de ADN con buena precisión. El uso más difundido de esta posibilidad ha sido el RNA-seq, donde el secuenciamiento directo de cADN permite detectar con excelente precisión variaciones en la cantidad de transcritos específicos en distintas condiciones experimentales, sustituyendo en la práctica el uso de microarreglos para estudio transcriptómicos (Marguerat & Bähler, 2010). De modo similar al que se cuentan transcritos de un genoma, se podría entonces utilizar el secuenciamiento masivo para contar las firmas presentes en una mezcla de amplificación.

Para poder llevar a cabo el secuenciamiento masivo de una mezcla de todos los productos de amplificación, como hemos explicado brevemente en el capítulo IV, es necesario **a) amplificarlos, y b) marcar cada uno de ellos de alguna manera para poder identificar de qué muestra y condición experimental proviene cada una de las firmas que se secuencia.** Una posibilidad para el marcado pudo haber sido la incorporación de adaptadores diferentes en los extremos de los productos de amplificación de cada muestra cómo se realiza en el caso de la tecnología TraDIS (Eckert, *et al.*, 2011) (ver Introducción, sección I.3.2), o alternativamente –como una variante más eficiente para incorporar la marca- utilizar oligonucleótidos con extremos diferentes para la amplificación por PCR de cada muestra. Esta última alternativa, que hemos comentado previamente en la sección IV.3.4., posibilita un marcado eficiente y de bajo costo a un número tan grande de muestras y condiciones como pares de cebadores se diseñen (Figura VI.1.).

La posibilidad de llevar a la práctica con éxito la aproximación experimental propuesta está vinculada a dos consideraciones principales. En primer lugar, para contar las firmas será determinante utilizar una plataforma de secuenciamiento que permita obtener un largo de lecturas que sea al menos de igual tamaño que los productos de amplificación. Téngase en cuenta que es necesario que cada producto de amplificación se secuencie completamente, porque los extremos 5' y 3' (por las secuencias de los cebadores usados) identificarán a que mezcla y condición pertenece la firma contenida entre ellos. La segunda consideración está relacionada con la cobertura; es decir con la cantidad de veces, en promedio, que cada producto de amplificación sea secuenciado. El número de lecturas/firma para una dada mezcla y condición debe ser lo suficientemente alto como para detectar variaciones con valor estadístico respecto del resto de las firmas acompañantes. Atendiendo esta condición, el valor absoluto de lecturas/firma dependerá por un lado de la capacidad de secuenciamiento de la plataforma utilizada, y por otro del número de reacciones de amplificación que se mezclen para alimentar al secuenciador.

A modo de ejemplo, el análisis de una mezcla de entrada (cualquiera) implicará la amplificación de 4 réplicas para cada firma (K y H), lo que significa un total de 8 reacciones de PCR, amplificadas cada una con cebadores diferentes. Luego del desafío en una única condición frente a las raíces obtendremos las mezclas de salida que significarán otras 8 reacciones de PCR (4 réplicas y 2 firmas). Es decir que por cada mezcla y condición experimental se necesitarán 16 reacciones de amplificación. Si cada reacción de amplificación contiene como máximo 412 firmas diferentes (una por mutante), y como valor de referencia nos proponemos contar al menos 100 lecturas promedio por firma-mutante dentro de la mezcla, se requerirá entonces el siguiente número de lecturas:

$$16 \text{ (reacciones de PCR)} \times 412 \text{ (mutantes)} \times 100 \text{ (veces que se lee cada producto)} \approx 660.000 \text{ lecturas}$$

Resulta así que por cada condición experimental y por cada mezcla analizada se requieren aproximadamente de 7×10^5 lecturas.

VI.3 Diseño de oligonucleótidos

Las secuencias variables asociadas a los oligonucleótidos P1, P2, P3 y P4 fueron diseñados por combinación de bases al azar. Según muestra el esquema de la figura VI.1. cada producto de amplificación lleva dos marcas, una marca 5' que establece la mezcla de la cual proviene ese producto, por ejemplo "mezcla 7"; y una marca 3' que establece la condición de experimentación correspondiente y el número de réplica, por ejemplo, "alfalfa 7 d.p.i., población LA, réplica 3" (Figura VI.1).

Según nuestro esquema de trabajo se requieren 15 extremos variables 5' para indicar la mezcla [mezcla 1, 2,.....mezcla 15], y 24 extremos variables 3' para indicar la condición y la réplica [6 condiciones, a saber: mezcla de entrada, alfalfa 3 d.p.i., alfalfa 7 d.p.i. LA, alfalfa 7 d.p.i. FA, arveja 7 d.p.i. LA, y arveja 7 d.p.i. FA todas ellas x 4 réplicas]. Si bien con tres bases hubiese sido suficiente para asegurar la variabilidad necesaria; decidimos utilizar 4 bases variables, y utilizar códigos todos diferentes tanto para los cebadores P1 y P2 como P3 y P4. Además, como es esperable que no todos los productos se puedan leer correctamente desde la primera base, se agregó una adenina 5'

terminal común a todos los cebadores. De esta manera, la longitud total de cada fragmento de amplificación resultó de 112pb (Figura VI.1). La secuencia de los cebadores diseñados, y la mezcla/condición/réplica a la que fueron asociados se encuentra en la sección II.4.5. de Materiales y Métodos. En la sección IV.3.4 del capítulo IV precedente hemos evaluado si los cebadores y sus extremos variables producían diferencias en la eficiencia de amplificación utilizando tres pares de cebadores distintos para la firma K y tres para la firma H. Las eficiencias entre firmas fueron similares en todos los casos (véase Figura IV.6.).

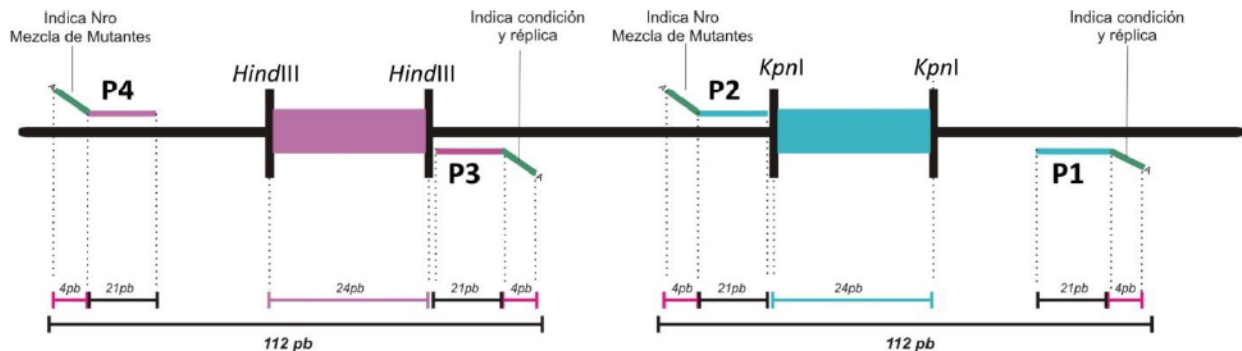


Figura VI.1. Etiquetado de productos de amplificación, con detalle de las secuencias empleadas en los cebadores (extremos 5' y 3') para codificar el número de mezcla analizada, la condición experimental y su réplica.

Las firmas presentes en cada muestra fueron amplificadas con oligonucleótidos P1 y P2 (firma K) y P3 y P4 (firma H). Los extremos 5' de cada cebador llevan una secuencia única ("marca") de 4pb que permite asociar el producto de amplificación a una mezcla/experimento en particular/réplica, y una adenina común a todos los cebadores. La longitud total de cada producto es 112pb. Ver texto.

VI.4. Seguimiento del esquema experimental

Una vez finalizados los desafíos realizados según el esquema inicial (Figura IV.7) las muestras de bacterias fueron procesadas según hemos descrito en el Capítulo IV y en la sección II.4.4. de Materiales y Métodos. Teniendo en cuenta todos los desafíos y réplicas, el total de muestras procesadas fue 360. En las siguientes secciones describiremos las etapas posteriores de este ensayo, y el modo en el que se construyó la mezcla final de productos de amplificación con la que se alimentó la etapa de secuenciación.

VI.4.1. Amplificación

Las amplificaciones fueron realizadas con los oligonucleótidos correspondientes a cada muestra por PCR-cuantitativa (qPCR). Ello se hizo en primer lugar para estimar la cantidad de genomas totales presentes en cada preparación (esto se hizo por inspección de los valores de Ct), y verificar para cada caso si las amplificaciones provenían de un número de genomas superior en al menos 1-2 log a la cantidad de mutantes inoculados (véanse consideraciones del capítulo IV precedente). Por otro lado, el seguimiento en tiempo real permitió conocer si la amplificación fue correcta (evaluado a través de los Tm de los productos) y obtener una idea estimativa de la cantidad de producto final (altura del *plateau* al final de la amplificación). En los casos donde por un motivo u

otro la amplificación no fue correcta, se realizaron nuevas extracciones de ADN de muestras de bacterias guardadas como duplicado, y se repitió la reacción de qPCR. A pesar de las condiciones optimizadas en el capítulo IV (sección IV.3.), las amplificaciones para la población FA (firmemente adherida) de las muestras de alfalfa 7 d.p.i. resultaron poco eficientes, dando valores de umbral (Ct) mayores a 22 (resultados no mostrados) que se corresponden con la presencia de menos de 1.000 copias molde/reacción (Figura IV.6). Estas muestras no fueron incluidas en el secuenciamiento dado que sus firmas carecían de la representatividad necesaria. Por lo tanto, de aquí en adelante sólo nos referiremos a 5 condiciones, eliminando la condición en la que pretendíamos analizar la población FA en alfalfa 7 d.p.i.. Teniendo en cuenta las 5 condiciones estudiadas, las 15 mezclas de mutantes analizadas, sus 4 réplicas y las 2 firmas evaluadas se realizaron un total aproximado de 600 reacciones de qPCR.

A modo de ejemplo, las curvas de amplificación obtenidas con cebadores P3 y P4 para la mezcla de mutantes N°4 se muestran en la Figura VI.2. Nótese que los valores de Ct más bajos y las unidades de fluorescencia más altas en general se encontraron asociadas a las muestras provenientes de los cultivos de entrada (líneas amarillas) donde el molde no es nunca una factor limitante tratándose además de ADN molde de buena calidad (para obtener ADN puede procesarse tanto volumen como sea necesario de la dilución de cultivo usada como inoculante). Por otro lado, en algunos casos, las unidades de fluorescencia resultaron menores para las muestras provenientes de arveja (algunas líneas rojas y violetas). Las raíces de estas plantas presentaron mayor cantidad de

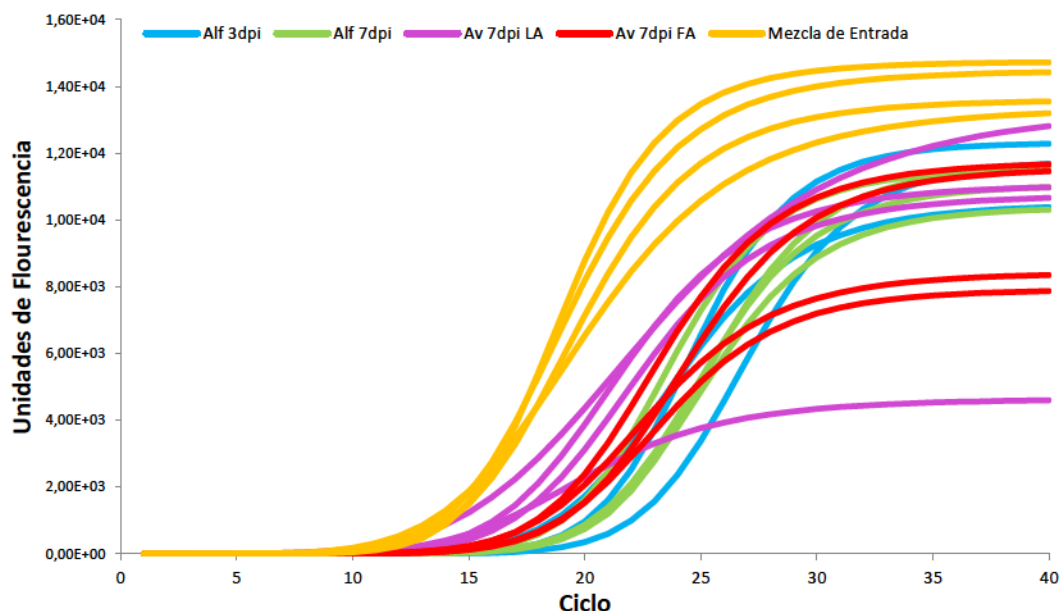


Figura VI.2. Curvas de amplificación de firmas de la mezcla de mutantes N°4 con cebadores P3 y P4.

Se muestra en diferente color el progreso de la amplificación para las muestras de ADN provenientes de los colonizadores de alfalfa y arveja a distintos tiempos postinoculación. Pueden observarse los Ct (eje x) variables obtenidos para cada tipo de muestra. Las mezclas de entrada, con mayor cantidad de ADN molde, presentaron los valores de Ct más bajos. Las muestras provenientes de plantas de alfalfa 3 d.p.i. mostraron los Ct más altos. Se aprecia, además, que la cantidad máxima de producto alcanzado (eje y) fue menor en algunos casos para las muestras de bacterias provenientes de raíces de arveja (algunas líneas rojas y violetas) (ver texto).

soporte adherido y no debe descartarse que el mismo haya generado algún tipo de inhibición. Otra posibilidad es que el mayor tamaño de las raíces comparado con alfalfa incorpore cantidades mayores de componentes inhibitorios de los propios exudados que no son removidos durante la extracción de ADN.

VI.4.2. Generación de la mezcla para secuenciamiento

El siguiente paso previo a la secuenciación consistió en conformar una única mezcla de amplicones con todos los productos de PCR, donde las firmas de cada combinación “condición-mezcla-réplica” ocupen un espacio de lecturas comparable luego de la secuenciación. Dicho de otro modo, construir una mezcla de amplicones de modo tal para que la capacidad total de secuenciación se distribuya regularmente entre los diferentes juegos de cuatrocientas firmas de cada experimento individual (combinación “condición-mezcla-réplica”). Para alcanzar tal objetivo la mezcla final para secuenciación debió construirse con cantidades aproximadamente equivalentes de cada uno de los productos de amplificación. El agregado de cantidades aproximadamente equivalente de cada producto de PCR se realizó atendiendo la intensidad de fluorescencia obtenida para cada tubo en el *plateau*, al final de la reacción de PCR (más intensidad, mayor cantidad de producto, menor agregado a la mezcla final) (ver construcción de la mezcla de secuenciación en Materiales y Métodos, sección II.4.6.).

Cabe mencionar aquí que el parámetro M presentado en el capítulo V sección 2.3. será definido ahora de modo análogo pero atendiendo al número de lecturas de cada firma en lugar de a intensidades en el microarreglo (ver Materiales y métodos sección II.4.8). Así, más allá de las consideraciones anteriores para normalizar la cantidad de secuencia destinada a cada producto de PCR, para obtener los valores de M de cada mutante no es estrictamente necesario mezclar cantidades exactamente iguales de todos los productos de amplificación. Los parámetros M (que referirán al cambio de representación de cada mutante a la salida respecto de la entrada en un experimento cualquiera) resultan siempre de considerar proporciones relativas entre firmas de una misma reacción de PCR. Tales proporciones no se alterarán si reciben un mayor o menor número de lecturas. Consideraciones similares a las realizadas para el parámetro M son aplicables al parámetro A.

VI.4.3. Secuenciamiento. Cálculo del número de lecturas requeridas. Elección de la plataforma.

En la sección VI.2. hemos discutido el método de recuento de firmas, y realizado un cálculo aproximado del número de lecturas requeridas para estudiar una condición experimental, con una mezcla de mutantes y cuatro réplicas.

En nuestro ensayo completo analizamos el comportamiento de 15 mezclas de mutantes (aprox. 6.000 mutantes totales) en 5 condiciones diferentes (sin la condición alfalfa 7 d.p.i. población FA). Como cada mezcla está compuesta de alrededor de 412 mutantes, y se amplificaron de cada experimento ambas firmas (K y H), la cantidad de lecturas requeridas resultó:

$$5 \text{ (4 muestras de salida, y su correspondiente muestra de entrada)} \times 15 \text{ (mezclas)} \times 412 \text{ (mutantes)} \times 4 \text{ (réplicas)} \times 2 \text{ (firmas)} \times 100 \text{ (veces que se lee cada producto)} \approx 25.000.000 \text{ de lecturas}$$

Nótese que dichas lecturas se distribuirán entre aprox. 250.000 “clases” de moléculas diferentes. Dichas “clases” están definidas por las secuencias 5' y 3' (indicando condición-mezcla-réplica-salida/entrada) y por la firma central (mutación específica para una cierta mezcla). Cada reacción de qPCR amplifica 412 “clases” de moléculas. La mezcla y el secuenciamiento se ajustaron para contar en promedio 100 veces cada “clase” molecular. La tecnología y plataforma de secuenciamiento debe permitir obtener, necesariamente y como mínimo; $2,5 \times 10^7$ lecturas de los amplicones de 112 pb esquematizados en la Figura VI.1. Además, la tecnología a utilizar debe presentar baja tasa de error para reconocer en búsquedas bioinformáticas las secuencias exactas de las firmas y las marcas introducidas en los extremos 5' de cada uno de los cebadores. En nuestro laboratorio tenemos experiencia en el uso de diferentes plataformas para estudios genómicos en rizobios, (454-Roche, Ion Torrent-PGM, MiSeq/HiSeq-Illumina, PacBio), cada una con características específicas de capacidad de secuenciación, de número y largo de lecturas, de tasa de error, y también de costos. Atendiendo especialmente la capacidad en cuanto a número de lecturas (que fuese compatible con el largo de 112 pb requerido para las mismas), y a la baja tasa de error buscada; optamos por la plataforma HiSeq 1500 de Illumina (hoy las plataformas HiSeq secuencian hasta cerca de 1.500 millones de lecturas, y del orden de 0,5 - 1 Tbase). El secuenciamiento fue realizado en el CeBiTec (Center for Biotechnology) Bielefeld, Alemania con quienes mantenemos una estrecha colaboración académica. Como resultado obtuvimos cerca de $1,25 \times 10^8$ lecturas de los productos de 112 pb (14 Gbases de secuencia, y 30 Gbytes de información) un valor que excedió en 5 veces el necesario estimado para el diseño de nuestro ensayo.

VI.4.4. Análisis informático y estadístico de secuencias.

Un desafío importante una vez obtenidos los datos de secuencia, correspondió a la minería de la vasta información que hubo que realizar para extraer los datos biológicos. En la mezcla existían cerca de 250.000 “clases” de moléculas diferentes (con una redundancia media esperada cercana al centenar, ver fórmula de la sección precedente), y los millones de lecturas sobre dichas moléculas debían ser analizados para contar cuantas veces cada “clase” se encontraba en la mezcla. Como dijimos, cada “clase” diferente de molécula dentro de la mezcla se caracteriza -y distingue del resto- por poseer sus propias 4 bases del extremo 5', del extremo 3', y su firma central. Al mismo tiempo, de acuerdo al diseño experimental cada “clase” resulta representativa de una condición, mezcla, réplica y gen (firma) afectado. Analizar la magnitud de información generada por el secuenciador (\approx 30 Gbytes en formato texto) en búsqueda de tres secuencias (*strings*) simultáneas, requirió el trabajo en colaboración con el Dr. Gustavo Parisi, quien realizó el diseño, escritura y ejecución de un programa en lenguaje C específicamente elaborado para contar la redundancia de cada “clase” de moléculas. Los detalles técnicos de la escritura de este programa se encuentran en la sección II.4.7 de Materiales y Métodos. La corrida del programa en un *cluster* conformado por 3 nodos demoró aproximadamente una semana, y dio lugar a diferentes archivos de salida. Cada archivo de salida correspondió al recuento de firmas (cada una de las 412) para una dada condición-mezcla-réplica. Nótese que cada archivo de salida incluye el conteo de una “familia” de “clases” de moléculas: moléculas con extremos iguales, y distintas firmas. Nótese además que cada “familia” de “clases” está asociada a una reacción diferente de PCR con la que fue amplificada (ver secciones

precedentes VI.3. y VI.4.1.), obteniéndose por tanto cerca de **1.200 archivos de salida al final del procesamiento informático primario**, cada uno de ellos con el recuento de moléculas para cada una de las firmas.

Una vez obtenido el dato de lecturas por firma, el análisis realizado fue similar al descrito anteriormente para el caso de intensidades de fluorescencia (ver Capítulo V.2). Brevemente, cada firma fue asociada a cuatro valores de lecturas de las “muestras de entrada”, y a cuatro valores de lecturas de las “muestras de salida” (en el caso de que alguna muestra haya resultado no procesable se tomaron tres valores). El valor promedio de las lecturas de secuencia para cada firma fue cercano a 200 (habíamos diagramado el ensayo para obtener cerca de un centenar por “clase”). **Cada valor de lecturas fue normalizado respecto del valor total de lecturas para esa “familia” de “clases” de moléculas** (similar a $%I_E$ e $%I_S$ presentados en el capítulo V, sección 2.3.). Los valores normalizados de las cuatro réplicas fueron promediados. Para cada firma se calcularon los valores de A , M y el *valor p* asociado a la prueba t (*Student*). Los cálculos de los valores de M , A , y el análisis estadístico de cada firma dentro de cada una de las “familias” de moléculas, se realizó utilizando macros de Excel alimentados con los archivos de salida del programa escrito en C (ver Materiales y Métodos, sección II.4.7.).

Cabe destacar por último que en el análisis final descartamos aquellos mutantes que en su mezcla de entrada estuvieron muy poco representados (filtrado por representación). Los mutantes fueron excluidos cuando su recuento (el recuento de su “clase” a través de la firma) era menor que 25% del valor medio del recuento de toda la “familia” analizada. La exclusión de mutantes muy poco representados (entre los cerca de cuatrocientos) en cada mezcla inicial, se realizó atendiendo a que números muy bajos al inicio del ensayo fueron acompañados por variaciones relativas grandes en los recuentos (error). Por dicha razón, no resultaron confiables a la hora de asignarles defectos de colonización aunque los mismos bajaran aún más su representación en la mezcla de salida.

VI.5. Análisis de resultados de la Mezcla N°1 desafiada en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i. Contrastación de los resultados con los obtenidos mediante el uso de microarreglos.

La Figura VI.3.A muestra la distribución de valores M alrededor de los valores A para los datos filtrados y procesados según se describió en la sección precedente. Puede observarse que esta distribución, al igual que la obtenida para el análisis de arreglos (Figura V.2.), responde a un patrón de simetría alrededor del cero. Por otro lado, en la Figura VI.3.B. se muestra una gráfica “volcán”, de distribución de los valores p (prueba t) en función del valor del M para la condición y la mezcla analizada (firma K en azul, firma H en rojo). Puede apreciarse en esta gráfica que los valores de $M < -1$ (varios) se encontraron mayormente asociados a valores p bajos ($p < 0,05$, ver también Tabla VI.1. siguiente). Sin embargo, no se encontraron valores mutantes que hayan aumentado su representatividad en más del doble ($M > 1$).

Del total de 412 mutantes en la mezcla inicial se encontraron lecturas correspondientes a 390 firmas distintas, de las cuales luego del filtrado según el criterio mencionado anteriormente se eliminaron 23 y 29 mutantes para la firma H y K, respectivamente. La comparación de los valores de

M calculados a partir de los datos de las firmas H y K permitió seleccionar luego aquellos mutantes en los que los resultados de ambas firmas eran concordantes (ambos negativos, o ambos positivos).

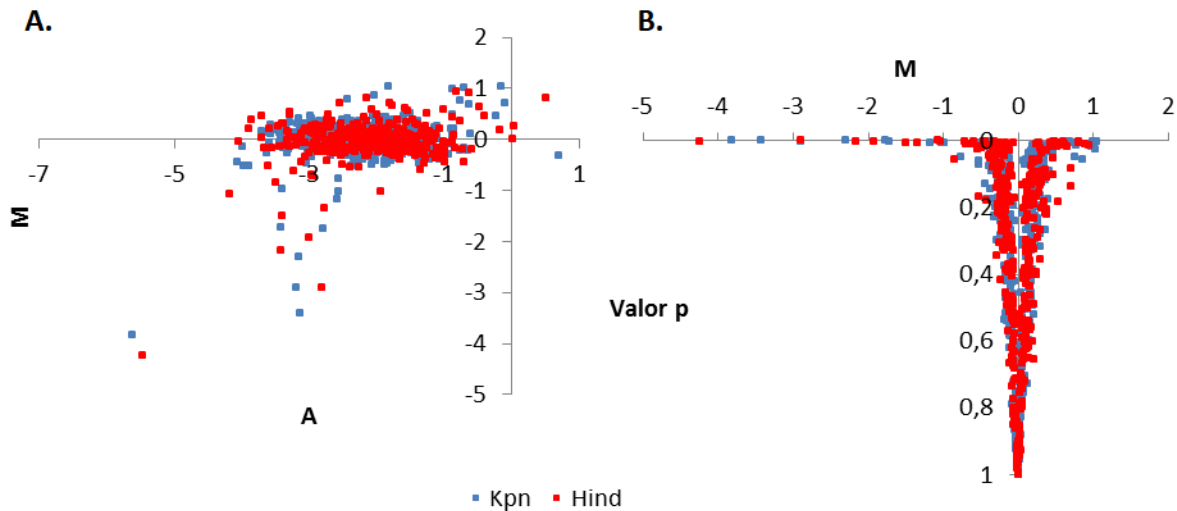


Figura VI.3. Análisis de datos de secuencias para la mezcla N°1 de mutantes desafiada en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i.

A. Gráfico de dispersión MA obtenido para los datos filtrados según se indica en el texto (sección VI.4.4.). B. Gráfico volcán de distribución del valor p (prueba t) para diferentes valores de M del ensayo analizado. Se observa que los mutantes potencialmente afectados en colonización presentan valores de $p < 0,05$ y M que pueden ser menores que -4 . Por el contrario, mutantes que resulten en potenciales mejoras en la colonización no superan valores de $M > 1$.

Se identificaron así 8 mutantes afectados negativamente ($M < -0,7$ tanto en la firma K como en la H) (Tabla VI.1), de los cuales 6 se corresponden con los obtenidos en el análisis con microarreglos presentado en el capítulo anterior (firmas 122, 188, 216, 276, 305 y 358). Los dos mutantes restantes fueron filtrados en los análisis de hibridación por tener baja fluorescencia en los arreglos de la muestra de entrada (firma 195), o por tener un valor p asociado mayor al límite de corte escogido ($p > 0,1$ en los microarreglos, firma 33). Si bien el número de mutantes afectados que se encontraron por secuenciamiento fue menor al encontrado en el análisis con microarreglos (8 frente a 12), los valores de p del primero resultaron entre uno y dos (o más) órdenes de magnitud menores a los obtenidos por hibridación (Tabla VI.1.). Por otro lado, las seis firmas listadas por el análisis de microarreglos (Tabla VI.1.B, líneas claras) que no se encuentran en la lista de firmas que surgen de la cuantificación por secuenciación (Tabla VI.1.A) son todas firmas que en este último análisis se encontraron asociadas a valores M cercanos a cero ($M > -0,3$) (resultados no mostrados). Nótese finalmente en los datos de la Tabla VI.1. que los valores de M tienen una mucho mejor correlación entre las firmas H y K, cuando los mismos se estiman por el método de secuenciación ($R^2_{\text{SECUENCIAS}} = 0,87$; $R^2_{\text{HIBRIDACIÓN}} = 0,31$).

A. Análisis de secuencias para mezcla N°1 - Alfalfa 3dpi

Firma	Valor M - K	Valor p - K	Valor M - H	Valor p - H
195(°)	-3,83	6,97E-05	-4,25	1,13E-03
216	-3,42	4,46E-05	-2,90	2,07E-04
122	-2,89	4,36E-04	-2,17	7,21E-04
33	-2,30	1,75E-06	-1,93	5,45E-04
276	-1,72	1,88E-03	-1,50	6,67E-03
358	-1,17	7,15E-03	-0,86	5,48E-02
188	-1,02	4,64E-03	-1,03	1,78E-03
305	-0,98	5,30E-03	-1,35	5,17E-03

⁽¹⁾ filtrado en el análisis de arreglos por poseer valor de $p > 0,1$

B. Análisis de microarreglos para mezcla N°1 - Alfalfa 3dpi

Firma	Valor M - K	Valor p - K	Valor M - H	Valor p - H
122	-3,62	2,88E-02	-3,60	7,92E-03
216	-2,66	2,88E-02	-2,93	4,48E-03
276	-1,64	5,03E-04	-2,49	8,41E-02
358	-1,88	2,46E-03	-1,87	5,77E-02
305	-0,99	3,59E-02	-2,70	7,12E-04
98	-1,83	6,27E-02	-1,33	6,22E-03
411	-0,92	4,10E-02	-2,20	1,87E-02
229	-2,11	6,94E-02	-0,85	1,07E-03
206	-1,39	7,75E-02	-1,29	5,09E-02
188	-1,02	6,96E-02	-1,28	1,86E-02
85	-1,28	8,97E-02	-1,01	4,41E-02
436	-1,24	5,67E-02	-0,90	4,67E-02

Tabla VI.1. Comparación de resultados obtenidos para firmas con $M < 0,7$ para la mezcla N°1 de mutantes, desafiada en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i., empleando cuantificación de firmas por: (A) Secuenciación y conteo bioinformático, ó (B) Hibridación de firmas en microarreglos.

La secuenciación y el conteo bioinformático de firmas permitió listar 8 mutantes afectados negativamente con $M < 0,7$ (en ambas firmas H y K) ($p < 0,05$) en la condición estudiada. Las listas de mutantes se encuentran en orden creciente de valor M promedio (H y K). En sombreado más oscuro se marcan los mutantes que también fueron identificados como afectados en el análisis con microarreglos del capítulo V precedente. El resto de los mutantes que se listaron como afectados en el análisis de arreglos se encontraron asociados a valores de $M > 0,3$ en el análisis de recuento de firmas por secuenciación.

Utilizando criterios similares hemos seleccionado cinco mutantes que aumentaron su representatividad después del desafío de acuerdo al conteo de firmas por secuenciación (Tabla VI.2.A). Sólo dos de estos cinco mutantes coinciden con los listados por el análisis de los arreglos (Tabla VI.2.B). En el caso de cambios de representatividad positivos, los valores de p asociados a cada uno de los métodos de análisis resultaron del mismo orden.

A. Análisis de secuencias para mezcla N°1 - Alfalfa 3dpi

Firma	Valor M - K	Valor p - K	Valor M - H	Valor p - H
250	1,04	9,31E-04	0,90	1,17E-02
177	0,98	1,69E-02	0,94	1,34E-02
152	0,86	5,52E-02	0,70	1,36E-01
478	0,75	4,64E-02	0,81	5,05E-03
460	0,72	5,11E-03	0,81	5,85E-04

B. Análisis de microarreglos para mezcla N°1 - Alfalfa 3dpi

Firma	Valor M - K	Valor p - K	Valor M - H	Valor p - H
161	1,35	2,21E-02	1,42	2,26E-02
211	1,31	6,02E-02	1,38	1,88E-02
250	0,83	5,42E-02	0,85	7,74E-02
466	0,84	9,36E-03	1,47	3,91E-02
478	1,57	2,86E-02	1,29	2,96E-02
10	0,97	4,76E-02	0,76	5,35E-02

Tabla VI. 2. Comparación de resultados obtenidos para firmas con $M > 0,7$ para la mezcla N°1 de mutantes, desafiada en condiciones de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i., empleando cuantificación de firmas por: (A) Secuenciación y conteo bioinformático, ó (B) Hibridación de firmas en microarreglos.

VI.6. Búsqueda a escala genómica de marcadores genéticos requeridos para la colonización de raíces de alfalfa por *S. meliloti* analizados a los 3 d.p.i.: Evaluación de las 15 mezclas de mutantes (más de 6.000 inserciones).

Con un análisis similar al que hemos presentado en las secciones anteriores para el estudio de la mezcla de mutantes N° 1, evaluamos el comportamiento del resto de las mezclas en las que la posición genómica de miniTn5 estaba disponible (15 mezclas totales, ver capítulo IV, sección IV.2.). La lista de mutantes que resultaron afectados negativamente en la colonización de raíces de alfalfa a los 3 d.p.i. puede verse en la Tabla 1 del Anexo I de esta tesis. La misma incluye los mutantes afectados para todas las mezclas estudiadas, con excepción de la mezcla N°11 que no pudo ser evaluada dado que en la etapa de amplificación de firmas por qPCR se evidenció que la cantidad inicial de ADN en esas muestras no era suficiente para garantizar la representatividad de las firmas de todos los mutantes. Para confeccionar esta lista, se seleccionaron los mutantes que presentaron valor $M < -0,7$ en las dos firmas H y K, exigiendo que (–una y otra–) reflejen un mismo comportamiento para cualquier mutante que se analice. La elección del valor de corte para el parámetro M se estableció en razón de que con dicho valor se observó una buena correlación entre los resultados de una y otra firma (consistencia). Valores de M menos negativos comenzaron a mostrar disparidad entre el comportamiento de la firma H y K. Por lo tanto, en esta primera mirada, la aproximación por STM-secuenciación a estudios de colonización radicular con las condiciones empleadas, parece identificar con consistencia mutantes afectados en al menos 60% ($M < -0,7$) su capacidad colonizadora respecto de la cepa salvaje. De 180 datos K y 195 datos H totales filtrados por el número de lecturas (ver filtrado de mutantes por baja representatividad en las mezclas de entrada en sección VI.4.4. precedente), 136 mutantes coincidieron en valores de $M < -0,7$ en ambas firmas. De éstos, sólo 2 tienen valor $p > 0,05$ en las dos firmas (ver Tabla 1 del Anexo I), reflejando una fuerte correspondencia entre la consistencia de ambas firmas (exigiendo $M < -0,7$) y el nivel de significación, lo que refuerza la robustez del criterio utilizado para la elección de mutantes. En la lista de la Tabla 1 del Anexo I también se incluyen 15 mutantes que sólo pudieron ser analizados por una de las dos firmas pero que mostraron valores $p < 0,05$. Se obtuvieron así un total de 151 mutantes seleccionados como potencialmente afectados negativamente en su capacidad de colonizar raíces de alfalfa a los 3 d.p.i.. Disponemos actualmente del sitio de inserción del mini-Tn5 para más del 85% de esos mutantes (la inserción debe ser aún caracterizada en 20 de los mutantes). Nótese que la Tabla 1 del Anexo I incluye el recuento del número de veces que cada gen fue detectado como interrumpido por un mini-Tn5 en mutantes independientes. Para el caso del gen *cheA*, por ejemplo, obtuvimos 6 mutantes independientes dentro del mismo gen. Casos de “redundancia” en el gen afectado fueron también detectados en genes como *fliM*, *flgK*, *soxA1*, *metA*, *ilvC*, *fbpB*, entre varios otros. Tal comportamiento convergente en la identificación por STM de alteraciones genómicas independientes dentro de un mismo gen, refuerza muy fuertemente el posible rol de las regiones afectadas en el fenotipo estudiado.

Los mutantes seleccionados como afectados positivamente se listan en la Tabla 2 del Anexo I. En este caso 94 mutantes presentaron valor $M > 0,7$ en las dos firmas, y se incluyen 13 que sólo pudieron ser analizados por una de las dos firmas con valores de $p < 0,05$. Los casos de “redundancia”

para los mutantes que aumentaron su representación a lo largo del desafío sólo fueron dos, *Smc01412* y *Smc04128*.

VI.6.1. Caracterización de los marcadores identificados, familias de ortólogos, predicciones funcionales.

A partir de la lista de mutantes del Anexo I avanzamos en la caracterización de las posibles funciones asociadas a los genes alterados. En las Figuras VI.4.A y VI.4.B se muestran la distribución de funciones posibles deducidas del análisis de COGs (*Clusters of Orthologous Genes*) para los genes que redundaron en efectos negativos y positivos, respectivamente. Para este análisis sólo se consideraron el número total de genes distintos afectados (104 para los afectados negativamente y 84 para los afectados positivamente).

El 25% de los genes mutados que derivaron en efectos negativos en la competitividad se encontraron relacionados al “metabolismo de aminoácidos”. Las siguientes categorías más numerosas correspondieron a “proteínas hipotéticas”, “transporte” y “transcripción, traducción y modificaciones postraduccionales” incluyendo 16,5%, 11,5% y 10,5% de los genes afectados, respectivamente (los genes de transporte de todo tipo de moléculas fueron incluidos en la categoría “transporte”). Le siguen en abundancia los grupos “quimiotaxis y movilidad” y “transducción de señales” (9,6% y 6,7%, respectivamente) incluyendo componentes asociados a procesos de regulación de la función celular. El resto de los mutantes se distribuyeron en otras categorías funcionales porcentualmente menos numerosas de forma relativamente equitativa. La clasificación de las mutaciones que derivaron en efectos positivos sobre la competitividad resultó muy diferente, obteniéndose como más representadas las categorías de “proteínas hipotéticas” (28,5%) y “transporte” (25%). El resto de los marcadores se distribuyeron en categorías variadas y menos numerosas. Nótese además que cerca de 14% de las inserciones en estos mutantes se encontraron dentro de regiones intergénicas, unidades repetitivas y transposasas.

Por último, teniendo en cuenta el carácter multipartito del genoma de los rizobios, y teniendo en cuenta que la transferencia horizontal de información es un mecanismo central en la evolución genómica de estas bacterias, analizamos cómo los marcadores anteriores se distribuyen entre el cromosoma y los dos megaplásmidos simbióticos. Como hemos mencionado en la introducción de esta tesis, *S. meliloti* posee un genoma de 6,7 Mpb distribuido en tres replicones: un cromosoma de 3,65 Mpb y dos megaplásmidos pSymA y pSymB de 1,35 y 1,68 Mpb, respectivamente (Galibert, 2001). Es además un hecho reconocido que mientras el pSymA aparece como un *pool* génico relativamente variable, el pSymB tiene mucho más homogeneidad respecto del contenido génico acercándose a las características de un segundo cromosoma (también hoy llamado crómido) (Galardini, *et al.*, 2011). En la Figura VI.5. se muestra la distribución por replicón de los marcadores que por STM parecen afectar negativa- (parte superior) y positivamente (parte inferior) la colonización de raíces de alfalfa a los 3 d.p.i..

Para los mutantes que se mostraron deficientes en colonización 85,6% de las mutaciones se encontraron dentro del cromosoma, situación que contrastó con la distribución de los marcadores con efecto positivo. En estos últimos la distribución entre el cromosoma y los pSyms fue más

equitativa. En cualquier caso, los resultados indican que la carga genética de la bacteria vinculada a la colonización inicial de la raíz se localiza mayoritariamente en el cromosoma, el replicón más conservado. Es así probable que varios de los genes cromosomales encontrados sean resultado de haber concentrado (optimizado), a lo largo de la evolución, funciones/estructuras requeridas para la interacción simbiótica temprana y también para otras actividades del ciclo de vida de la bacteria.

A.

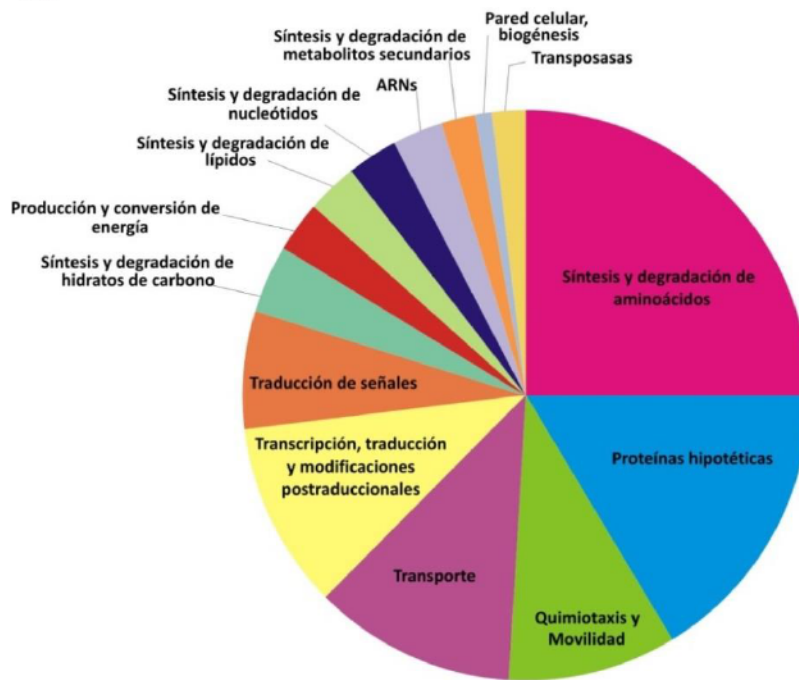
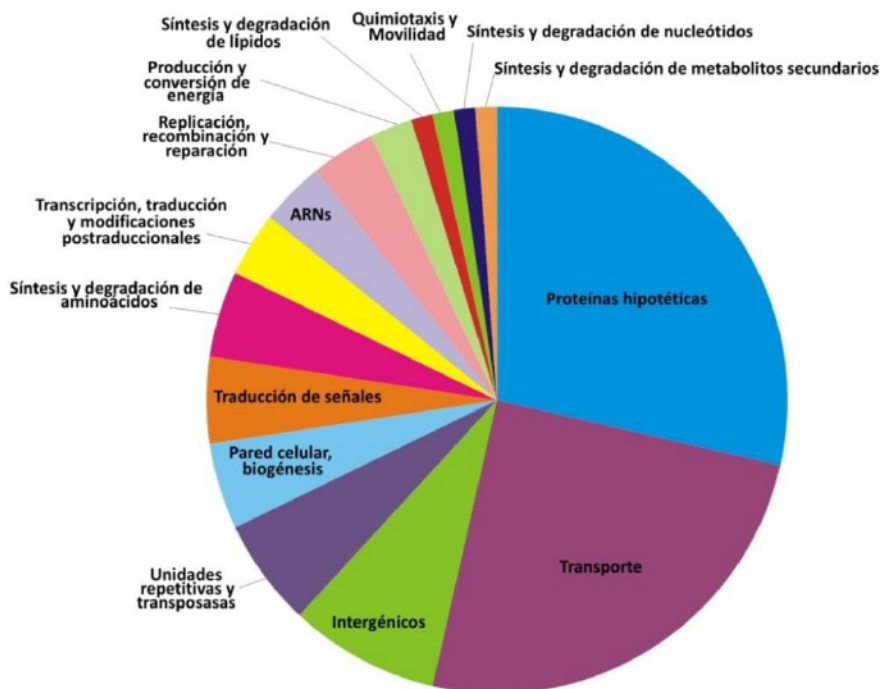


Figura VI. 4. Clasificación funcional de genes seleccionados por STM por su efecto negativo (parte A) o positivo (parte B) sobre la colonización de raíces de alfalfa analizadas a los 3 d.p.i..

La clasificación realizada se basó en el análisis de grupos de ortólogos (COGs) (ver texto). Los gráficos fueron realizados en base a 104 (parte A) y 84 (parte B) genes (del total de mutantes se tomó el número total de genes).

B.



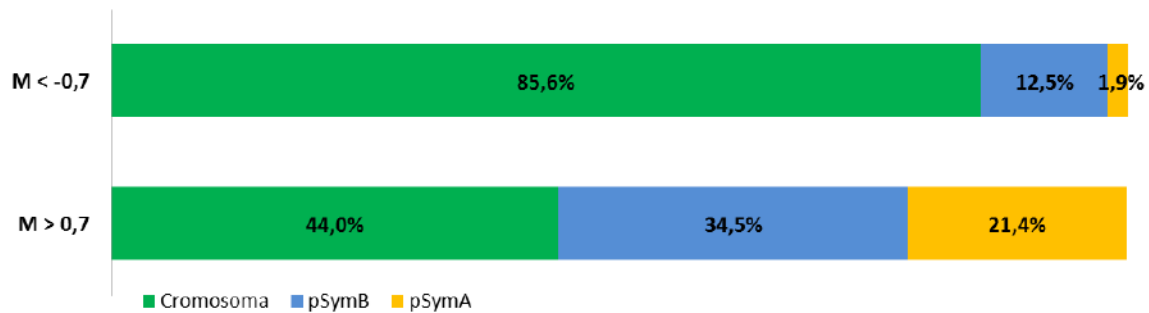


Figura VI. 5. Distribución de mutaciones según el replicón en el que se encuentran.

Los mutantes fueron clasificados por el replicón en el que llevan la inserción del mini-Tn5. Los mutantes afectados negativamente en la colonización de plantas de alfalfa a los 3 d.p.i. (parte superior, $M < -0,7$) se encontraron mayormente afectados en genes codificados en el cromosoma. Las mutaciones que derivaron en efectos positivos en las mismas condiciones de análisis (parte superior, $M > 0,7$), se encontraron más equitativamente distribuidas entre los diferentes replicones (aunque también con predominancia cromosomal).

VI.7. Marcadores genéticos requeridos para la colonización de raíces de alfalfa por *S. meliloti* evaluada a los 7.d.p.i.. Análisis comparativo con los marcadores identificados a los 3 d.p.i. (sección anterior).

El análisis de los rizobios recuperados de raíces de alfalfa a los 7 d.p.i. permitió identificar 157 marcadores que afectaron negativamente la colonización. De los 157 mutantes identificados, 47 no fueron encontrados como afectados a los 3 d.p.i. (ver Tabla 1 en Anexo II y Tabla 1 en Anexo I). Es importante mencionar que 16 de los mutantes sólo identificados a los 7.d.p.i. corresponden a la mezcla N°11 que, como hemos mencionado en la sección VI.6., no pudo ser analizada a los 3 d.p.i. (en la tabla, columna 3 d.p.i., "No analizados") por no contar con suficiente ADN de las bacterias recuperadas de raíces. El análisis de esta lista nos permitió identificar 20 genes/regiones génicas (representados por 22 mutantes) que demostraron encontrarse afectados específicamente a los 7 d.p.i.). Entre estos nuevos genes identificados se encuentran *Smc00566*, *fbcb*, *mcpX*, *glxB*, *glxC*, *Smb20211*, *Smb20721*, *Smb20724*, *Smb20725*, *Smb20757* entre otros. También dentro de esta lista se encuentran 3 mutantes que, si bien no fueron seleccionados dentro de los afectados a los 3 d.p.i., representan genes que sí fueron encontrados en esta condición (es decir, otros mutantes en los mismos genes, en la tabla columna 3 d.p.i., "otra inserción"). Más allá de las variaciones propias de la metodología asistida por STM, puede en principio pensarse que entre los genes sólo detectados a los 7 d.p.i. existan algunos cuya relevancia está asociada a etapas algo más tardías de la colonización, incluido el uso de exudados de la planta, o la propia unión con la raíz. Más difícil de explicar, más allá de las variaciones metodológicas, es la existencia de 24 genes encontrados como afectados sólo para la colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i. (marcados en la tabla 1 Anexo I, columna 7 d.p.i. con el texto "NO").

Vale la pena mencionar, además, que si se tienen en cuenta los mutantes analizados en ambas condiciones, el 80% de los listados a los 7 d.p.i. coinciden con los listados a los 3 d.p.i. (marcados tabla 1 anexo II, columna 3 d.p.i. con el texto "SI"). Es probable que varios de estos genes encontrados en ambos análisis (3 y 7 d.p.i.) correspondan a aquellos cuyos productos son

relevantes desde el comienzo de la interacción con la raíz, impactando en el análisis más allá del tiempo de muestreo.

Del total de 95 mutantes seleccionados como afectados positivamente a los 7 d.p.i., listados en tabla II Anexo II, 63 coinciden con los listados a los 3 d.p.i.. Por otro lado, 32 mutantes (Tabla 2 del Anexo II) fueron sólo reconocidos como afectados positivamente a los 7 d.p.i. (5 de estos mutantes provenientes de la mezcla N°11 fueron únicamente analizados a los 7d.p.i.).

La disponibilidad en la década de los '90 de las nuevas técnicas de hibridación a escala ómica permitió abordar nuevos estudios de evaluación fenotípica (*screening*) de mutantes bacterianos en grandes números y de modo simultáneo, haciendo uso de la identificación (cuantitativa) de secuencias específicas introducidas *a priori* dentro de cada uno de los genomas mutados (sección I.3.2.). Esta capacidad aplicada al campo de la rizobiología posibilitó la evaluación de centenares de mutantes en sus propiedades de competición por la nodulación, y en su tolerancia a diferentes estreses como situaciones fisiológicas de interés básico y aplicado (Pobigaylo, 2006, Pobigaylo, *et al.*, 2006). Lamentablemente, la evaluación fenotípica de miles a decenas de miles de mutantes para asegurar una mutagénesis a saturación (y evaluar a intervalos de unos pocos cientos de bases las diferentes posiciones no letales del genoma) resultaba aún igualmente impracticable debido a la necesidad usar miles de microarreglos en ensayos de hibridación. Tal limitación, y las restricciones vinculadas a los bajos números de bacterias en la rizósfera que ya hemos discutido, han sido los principales factores que limitaron el estudio genético a escala ómica de la vida más temprana de los rizobios en la rizósfera. Los estudios hasta el presente han estado limitados a la evaluación clásica de mutantes individuales que, sospechados de defectos que resulten en alteraciones tempranas, eran evaluados individualmente en sus capacidades simbióticas (Caetano-Anolles, *et al.*, 1988b, Gao, *et al.*, 2014, Koch, *et al.*, 2014).

En este capítulo hemos implementado la utilización de tecnologías de secuenciamiento de alta capacidad en ensayos de STM para la búsqueda de genes de *S. meliloti* vinculados a la colonización rizosférica de alfalfa. Más allá del interés particular de nuestro laboratorio en estudiar con etapas simbióticas tempranas, el diseño experimental presentado en este capítulo representa el primer reporte de combinación de tecnologías de STM y secuenciamiento de segunda generación, con el resultado de haber aumentado en un factor de entre 10 y 100 el número de condiciones experimentales y mezclas de mutantes analizables. Las condiciones de ensayo que hemos utilizado resultaron en CV% (coeficiente de variación) en las señales procesables (contajes de secuencias) de entre 10-20%. El análisis comparativo de los resultados obtenidos en microarreglos y por secuenciación con el diseño que hemos presentado, mostró que este último -además de ser más simple tanto en lo operativo como en el análisis posterior- permite obtener resultados con mejores niveles de confianza (valores *p* menores).

Como resultado final del estudio hemos podido seleccionar 151 mutantes que disminuyeron su representación a lo largo del desafío en plantas de alfalfa (afectados negativamente en esta condición, representando un total de 104 genes), y 107 mutantes en los que se detectó un cambio

positivo en la representatividad; en ambos casos cuando el comportamiento se evaluó a los 3 d.p.i.. El análisis a los 7 d.p.i. reveló que en esta condición 109 genes son requeridos para la colonización de las raíces de alfalfa. La clasificación de los genes cuyas mutaciones derivan en efectos negativos en la competitividad por la colonización de plantas de alfalfa a los 3 d.p.i. permitió asociar el 25% de los mutantes a afecciones en genes relacionados con la biosíntesis y degradación de aminoácidos, y con los valores más negativos de M (en general entre -2 y -6, Tabla 1 Anexo I). La relevancia del metabolismo de aminoácidos en la infección de raíces por rizobios ha sido estudiada para varios genes sobretodo en etapas tardías donde se ha evaluado la capacidad de los mutantes de formar nódulos o de fijar nitrógeno eficientemente. Es un hecho conocido que para la simbiosis tardía es esencial el transporte de aminoácidos por parte de la planta al bacteroide, que una vez diferenciado se convierte en auxótrofo para los aminoácidos ramificados (de las Nieves Peltzer, *et al.*, 2008, Prell, *et al.*, 2009). Por otro lado, parte del nitrógeno fijado es exportado hacia la planta como alanina o aspartato (Udvardi & Poole, 2013). En etapas más tempranas, se ha encontrado que los genes *leuA* e *ilvC* son necesarios para la infección (López, *et al.*, 2001, Sanjuán-Pinilla, *et al.*, 2002) y que la prolina deshidrogenasa (ProDH) es necesaria para en la competitividad para la nodulación (Jiménez-Zurdo, *et al.*, 1995). Evidentemente las vías de síntesis, degradación y transporte de aminoácidos cumplen un rol en la simbiosis que es más amplio que solo satisfacer las necesidades nutricionales de la bacteria, y los resultados aquí presentados muestran que el metabolismo aminoacídico es importante desde los primeros contactos con la planta. Como hemos enunciado en la introducción de esta tesis, la rizósfera es un ambiente rico en nutrientes y se considera que los aminoácidos, después de los azúcares, son los compuestos más importantes exudados en términos de cantidad (Moe, 2013), habrá que analizar, por tanto, si es que estos mutantes recuperan la capacidad de colonización en presencia de cantidades no limitantes de aminoácidos o si los productos del metabolismo de estos aminoácidos cumplen otro rol en este entorno.

Los mutantes que llevaron la inserción del mini-Tn5 en genes de quimiotaxis y movilidad representaron 9,6% de los mutantes afectados. Los valores de M asociados a estos mutantes, en general, se encontraron entre valores M de -1,5 a -1. Estas diferencias observadas en los valores de M asociados a ciertas funciones/cluster de genes, evidencia que existen mecanismos más relevantes que otros en las etapas de asociación con la planta.

Las proteínas hipotéticas quizá representan el conjunto de genes de mayor interés por tratarse de proteínas funcionalmente involucradas en la colonización y cuya función es aún desconocida. Los valores de M asociados a estos mutantes fueron en general (y como es esperable) más variables. En el análisis posterior de los mutantes STM deberá tenerse en cuenta la posibilidad de que existan efectos polares generados por la inserción del mini-Tn5, ya que el transposón utilizado para realizar la biblioteca de mutantes posee una secuencia terminadora de la transcripción del gen *trpA* (T_{trpA}) (Wilson, *et al.*, 1995, Reeve, *et al.*, 1999). Esta posibilidad deberá ser considerada siempre que los genes río abajo del gen afectado se encuentren en el mismo sentido. En esos casos, la confirmación de que un determinado gen es efectivamente relevante para la colonización (y no alguno de los que se encuentran río abajo) deberá ser confirmada por ensayos de complementación/delección en marco sin efectos polares.

En el siguiente capítulo compararemos los mutantes aquí obtenidos con raíces de alfalfa respecto de los mutantes que emergen de un estudio similar realizado con raíces de arveja, en búsqueda de eventuales productos génicos asociados a efectos específicos. Presentaremos así mismo la evaluación individual de mutantes escogidos frente a la cepa salvaje en ensayos de doble inoculación hacia la validación por plaqueo de los resultados de STM aquí presentados.

Capítulo VII

Validación y caracterización de las deficiencias de colonización de clones mutantes seleccionados por STM-secuenciamiento.

Búsqueda e identificación de genes de *S. meliloti* asociados preferencialmente a la colonización de raíces de su planta hospedadora alfalfa.

VII.1. Validación de los resultados obtenidos por STM-secuenciamiento y evaluación del comportamiento diferencial de los mutantes de *S. meliloti* afectados en la colonización.

En el capítulo precedente hemos presentado la búsqueda a escala genómica de marcadores de *S. meliloti* vinculados a la colonización de raíces de alfalfa, su planta hospedadora. Como resultado del estudio hemos identificado diferentes mutaciones que parecen modificar el comportamiento del rizobio durante la colonización radicular. Debe tenerse sin embargo en cuenta que, por las características de la tecnología utilizada en el estudio, la evolución de la colonización rizosférica sólo se evaluó indirectamente a través del conteo de secuencias de ADN específicas de cada mutante al inicio y al final del ensayo. Por tanto, y como hicimos con el ensayo de STM con microarreglos como metodología de cuantificación (Capítulo V, sección V.2.2. y V.2.3.), evaluaremos ahora si los fenotipos observados por STM-secuenciación pueden ser validados en ensayos de conteo directo de los rizobios rizosféricos colonizantes. Debe recordarse que la Mezcla N° 1 que se analizó tanto por microarreglos como por secuenciación arrojó varios resultados concordantes (capítulo VI, Tablas VI.1. y VI.2.), con mutantes que mostraron cambios similares al utilizar una u otra tecnología. Más allá de esta observación, en esta sección analizaremos en ensayos de doble inoculación y plaqueo, inoculando la cepa salvaje como control interno, la capacidad de colonización de varios de los mutantes identificados en el capítulo precedente, y listados en las Tablas 1 y 2 del Anexo I. La evaluación, es parte de la estrategia general que delineamos inicialmente en el esquema de la Figura IV.7. del capítulo IV. Para la evaluación fenotípica seleccionamos 12 mutantes de la Tabla 1 del Anexo I que por STM aparecen alterados en colonización ($M < -0,7$; y con valores diversos), y 4 mutantes con mejoras en su capacidad colonizadora ($M > 0,7$), de la tabla 2 Anexo I. La capacidad de colonización de esos mutantes junto a la cepa salvaje marcada con *gfp-Tc^R* (Pistorio, *et al.*, 2002) e inoculada en números comparables fue evaluada a los 3 d.p.i. (Materiales y Métodos, sección II.4.9.). En la Figura VII.1., se muestran los valores de M obtenidos por plaqueo (M^{plaqueo}) para cada uno de los mutantes, junto a los valores de M obtenidos en el ensayo de STM-secuenciación (M^{STM}) (véase primera y segunda líneas debajo de la gráfica, respectivamente). Once de los 12 mutantes estudiados con $M^{\text{STM}} < -0,7$ demostraron, a distintos niveles, encontrarse afectados en la colonización de la rizósfera de alfalfa a los 3 d.p.i.. El mutante en el gen *Smc04127* ($M^{\text{STM}} = -0,93$ y $M^{\text{plaqueo}} = -0,26$) fue el único que no mostró cambios significativos en su capacidad de colonización respecto de la cepa salvaje ($M = 0$). Estos resultados validaron la presunción de alteraciones en la colonización en prácticamente todos los mutantes evaluados (escapó sólo el mutante con mayor valor de M), y muestran al método de STM-secuenciación como una herramienta potente para el estudio que hemos realizado. Es esperable que todos los mutantes de la Tabla 1 del Anexo 1 y los de la Tabla 1 Anexo II presenten un comportamiento similar, que deberá ser evaluado oportunamente.

VII.2. Evaluación de la correlación entre los valores de “M” del experimento de STM-secuenciación (M^{STM}), y los obtenidos en los ensayos de recuento por plaqueo (M^{plaqueo}).

Teniendo en cuenta todos los ensayos de validación de la sección anterior, y los que mostraremos en la sección siguiente de ese capítulo; realizamos un gráfico de correlación entre los

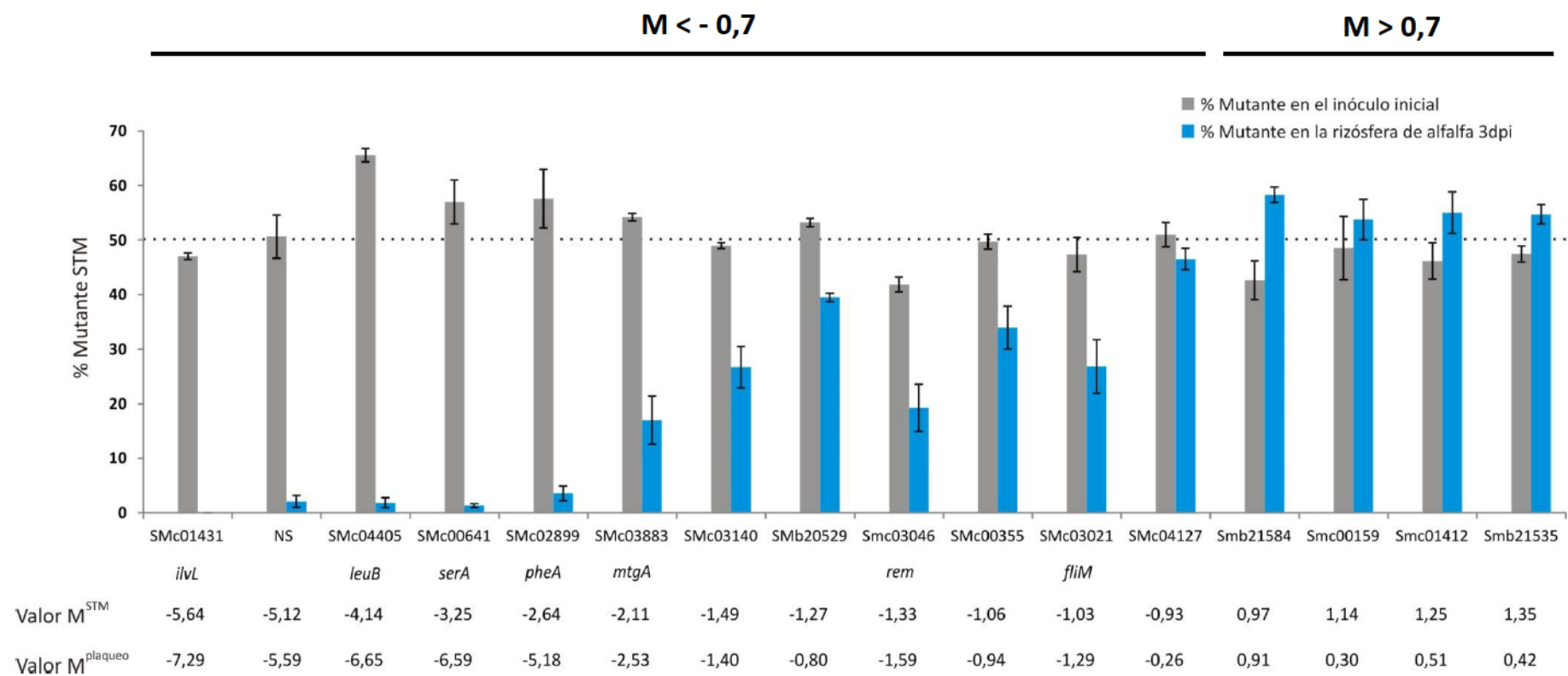


Figura VII. 1. Desafíos de validación. Competición por la colonización de la rizósfera de plantas de alfalfa 3 d.p.i..

Los mutantes seleccionados, por encontrarse asociados a un amplio rango de valores de M fueron desafiados en ensayos de competición por la colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i. frente a la cepa salvaje marcada con la proteína verde fluorescente (GFP) 2011 MP6, (Pistorio, *et al.*, 2002), utilizando un título de inóculo aproximado de 1×10^5 u.f.c./ml. El porcentaje de mutante asociado a la rizósfera y en el inóculo inicial fue medido por plaqueo y posterior recuento de bacterias que no expresan *gfp*/totales. Las barras de error representan el error estándar del valor medio obtenido a partir de tres réplicas biológicas.

valores de M^{STM} y M^{plaqueo} que incluyó 30 puntos y se muestra en la Figura VII.2. La línea de tendencia trazada para este conjunto de puntos arrojó una pendiente con valor cercano a la unidad, y un coeficiente de correlación $r = 0,9$.

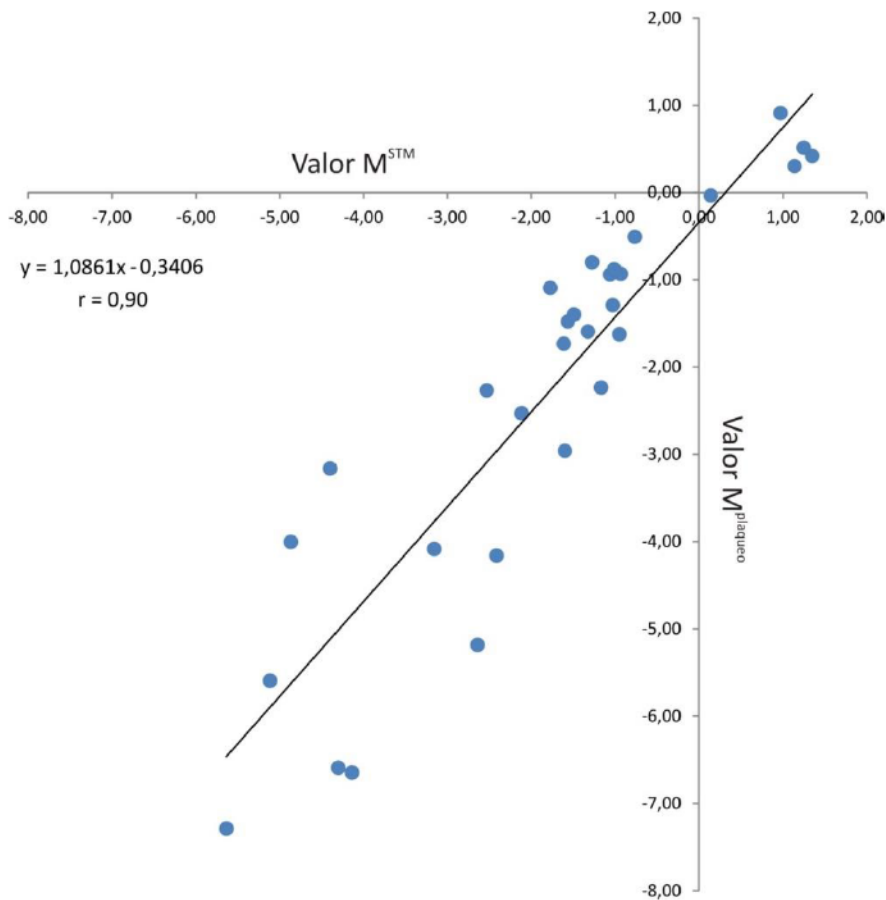


Figura VII. 2. Gráfica de correlación entre los valores de M obtenidos en el ensayo STM-secuenciamiento (M^{STM}), y los obtenidos en los desafíos de cada mutante frente a la cepa salvaje en los que la colonización se evaluó por plaqueo (M^{plaqueo}).

El valor M^{STM} promedio entre las firmas K y H fue graficado en función del valor M^{plaqueo} . La gráfica incluye valores para 30 mutantes. En la ecuación de la recta que se muestra en el extremo superior derecho $y = M^{\text{STM}}$; $x = M^{\text{plaqueo}}$; pendiente= 1,08; ordenada al origen = 0,34; $r = 0,90$. En los casos de genes afectados por más de una inserción se utilizó el valor M promedio obtenido por los todos los mutantes que afectaron ese gen.

Más allá de que los mutantes con $M^{\text{STM}} < -1$ resultan mayoritariamente afectados en la colonización (sección anterior), se aprecia ahora, además, que los valores de M^{STM} tienen una muy buena correlación (en signo y valor absoluto) con los obtenidos en ensayos en los que cada mutante se enfrenta individualmente a la cepa salvaje, y se cuenta por plaqueo (M^{plaqueo}). La observación, da valor cuantitativo y homologa las estimaciones de M realizadas por uno y otro método.

VII.3. Estudios de crecimiento en diferentes medios de mutantes afectados en la colonización.

Surge en esta instancia la pregunta general vinculada al tipo de efectos (globales/específicos) que son origen y dan lugar a las deficiencias en la colonización en los diferentes mutantes que hemos identificado. Resulta esta una cuestión central desde lo biológico (y lo bioquímico) que podrá ser analizada en detalle a partir del material colectado como producto de los estudios de este trabajo de tesis. Respuestas en esa dirección permitirán conocer los mecanismos más tempranos de comunicación entre los simbioses, estudiar el grado de especificidad y generalización de los mismos en otras interacciones (de distinto tipo), el probable origen y evolución de los mismos, y eventualmente utilizar el conocimiento con propósitos aplicados. Un grupo de deficiencias posibles abarca a todas aquellas que puedan ser de carácter nutricional en términos genéricos. En particular aquellas que deriven de la incapacidad de utilizar algún componente rizosférico (mineral u orgánico específico) limitante para el crecimiento (tal incapacidad puede ser por defectos en el transporte de ingreso a la célula, o por deficiencias metabólicas internas). Otros genes podrán estar vinculados a cambios en la eficiencia de acercamiento a la raíz (movilidad, quimiotaxis), en la tolerancia de toxinas generadas por la propia planta, en la generación de componentes que puedan estimular a su vez la secreción de componentes por parte de la raíz, etc. Esta última, sin embargo, parece poco probable que hayan tenido algún efecto en nuestros ensayos dado que los mutantes afectados de cada mezcla fueron unos pocos, probablemente sin generar limitaciones en las señales a la planta emitidas por el conjunto de rizobios mayoritariamente salvaje.

Para evaluar entonces en una primera mirada la respuesta de crecimiento de algunos mutantes defectivos en colonización frente al contacto con diferentes medios extracelulares, analizamos: **a)** el crecimiento en exudados radiculares de alfalfa, **b)** el crecimiento en medio mínimo de Evans (definido), **c)** el crecimiento en medio rico TY (véase Materiales y Métodos sección II.1 para la composición de los últimos dos medios de cultivo), y **d)** la capacidad de colonizar raíces de alfalfa a los 3 d.p.i. para validar el grado de afección en colonización de cada uno de los mutantes. En la Figura VII.3. se muestran los resultados del ensayo para un conjunto de 9 mutantes seleccionados de la Tabla 1 Anexo I, en su mayoría con $M^{STM} < -1$, y de un mutante control con $M^{STM} \approx 0$ (*Smc03113*, $M^{STM} = 0,14$). Para el estudio seleccionamos mutantes que se mostraron afectados al analizar ambas firmas (H y K) y que portan mutaciones en proteínas hipotéticas; o en proteínas de función conocida pero que no han sido asociados previamente a fenotipos defectivos en simbiosis. El mutante *Smc03113* empleado como control no lo hemos observado afectado en colonización en ninguna de las condiciones estudiadas. A partir de los resultados obtenidos hemos podido agrupar a los mutantes en los siguientes grupos, según su comportamiento:

Grupo A. Mutantes afectados en todas las condiciones analizadas (ej. *Smc00622*). Mutantes posiblemente afectados en genes que cumplen un rol general para el normal crecimiento de los rizobios. Genes con un rol central para la vida de las bacterias, y aún de función desconocida, resultan particularmente interesantes. Como ya hemos mencionado anteriormente, las “Mezclas” de mutantes (1 a 15) fueron todas crecidas por pocas generaciones en medio rico TY antes de ser

inoculadas a las raíces (Materiales y Métodos, sección II.4.2.), por lo que es esperable que el número de mutantes de la colección general que correspondan a este grupo sea reducido.

Grupo B. Mutantes con crecimiento normal en medio rico, pero que se encuentran afectados en su crecimiento en medio mínimo y en exudados radiculares de alfalfa. Es probable que este grupo esté poblado de auxótrofos (como *Smc00488-purL*) o de mutantes en transportadores asociados a iones o compuestos no sintetizados por los rizobios (como el transportador de potasio *Smb21555-kefB*). Resultan de especial interés aquellos de función desconocida (como el *Smc02123*).

Grupo C. Mutantes con crecimiento normal en los medios de cultivos ensayados, pero que se encuentran afectados en su crecimiento (/persistencia/sobrevivencia) en exudados (*Smc00963*, *Smc02407*, *Smc01143*). Este grupo de genes son posiblemente necesarios para la colonización del entorno radicular y resultan los más interesantes desde la fisiología de la interacción con el hospedador y desde el punto de vista simbiótico.

Grupo D. Mutantes con crecimiento normal en todos los medios ensayados pero que, como todos los mutantes anteriores, se encuentran afectados en la colonización de la rizósfera. Este grupo de genes se encuentra, seguramente, funcionalmente asociado a efectos importantes para la colonización pero no nutricionales (ej. el gen *Smc03005-cheW1* vinculado a la quimiotaxis). Aunque el mutante en el gen *Smc00775-fbpB* está afectado en un posible transportador de hierro, la presencia de 15 μM citrato férrico (ver Materiales y Métodos, sección II.3.3.) en el medio de Fåhraeus usado para colectar los exudados, puede eventualmente subsanar deficiencias que se expresan en concentraciones más bajas de ese elemento (dependerá del K_m^{Fe} del transportador, etc). Deberá analizarse por otra parte si la afección observada en la colonización realizada también en medio de Fåhraeus, deriva o no de limitaciones de dicho elemento que se expresan en el entorno radicular de la planta.

Más allá de las consideraciones realizadas precedentemente para mutantes en genes particulares, hasta que no se analice cada uno de los sitios de transposición de modo detallado con su entorno genómico (genes río abajo), debe siempre considerarse la posible existencia de efectos (transcripcionales) polares.

VII.4. Efectos simbióticos tardíos de las deficiencias en la colonización rizosférica temprana de alfalfa por *S. meliloti*: Evaluación de la competición por la nodulación.

Un hecho particularmente interesante es que 18 de los mutantes identificados como afectados en la colonización de la rizósfera en el capítulo VI precedente se encontraron también afectados en la competición por la nodulación en el estudio realizado por Pobilgaylo et al. (2008), incluyendo mutantes en los genes *ilvC*, *ilvD*, *ilvL*, *metA*, *ccmC*, *pyrE*, *thiC*, *trpF*, y *clpA* entre otros. Muchos de estos genes han sido estudiados en detalle en diferentes rizobios donde las deficiencias se han asociado a distintos efectos en el desarrollo de la infección (Vineetha, et al., 2001, Abbas, et al., 2002). Estas observaciones apoyan la hipótesis de que los eventos que ocurren durante los primeros estadios de colonización de la raíz son importantes en la definición de cuáles serán las cepas que ocuparán el espacio simbiótico, que como hemos mencionado es limitado.

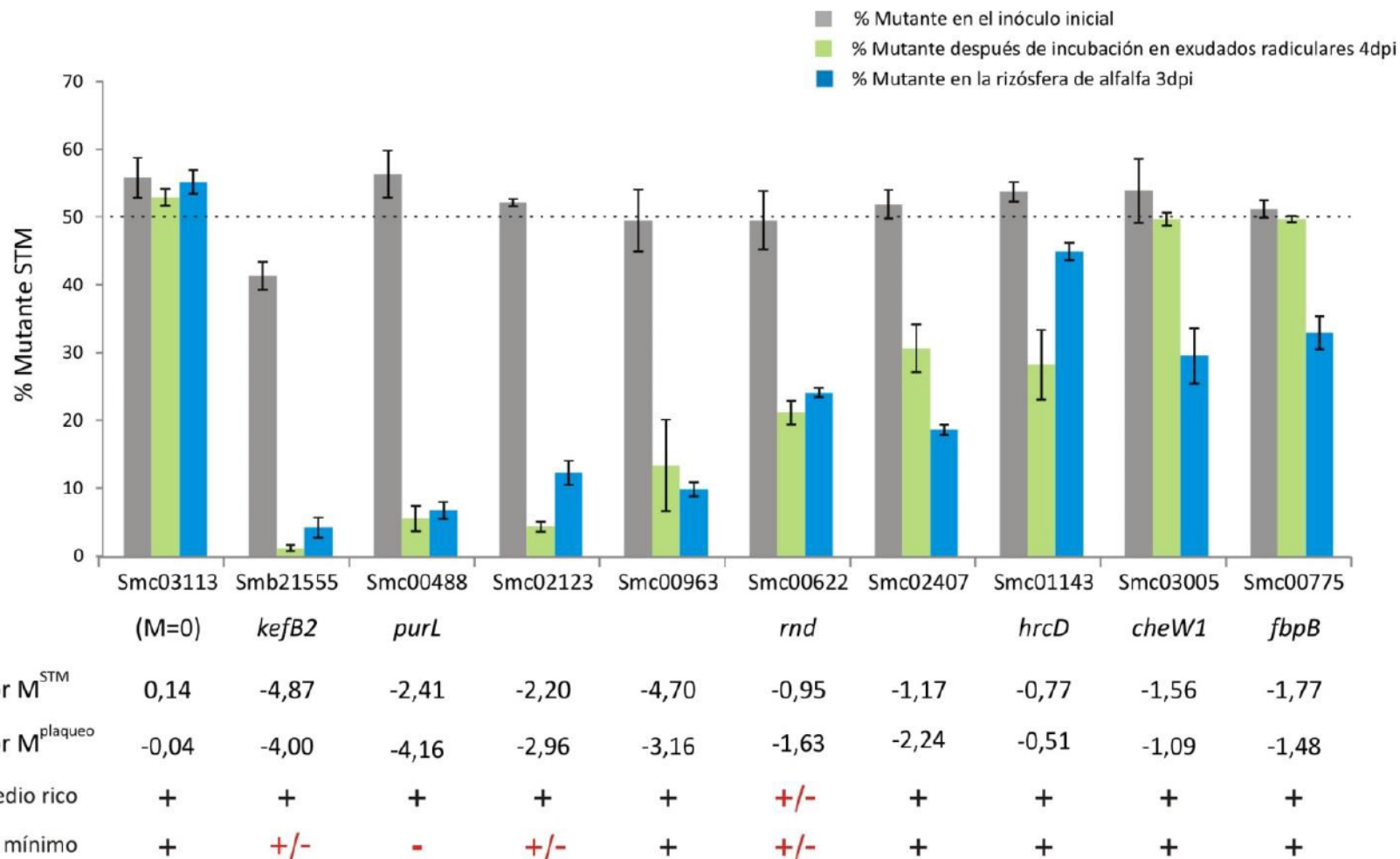


Figura VII. 3. Comportamiento diferencial de los mutantes afectados en colonización.

Se estudió el comportamiento de 10 mutantes en crecimiento en medio rico y medio mínimo (parte inferior de la figura), competición por el crecimiento en exudados (barra verde) y competición por la colonización de rizósfera de alfalfa (barra azul). Los ensayos de competición fueron medidos por plaqueo y posterior recuento de bacterias que no expresan *gfp*/totales. Las barras de error representan el error estándar del valor medio obtenido a partir de tres réplicas biológicas. Las curvas de crecimiento de los rizobios fueron realizadas en medio rico TY y medio mínimo Evans a 28 °C y 180 r.p.m. por seguimiento de la DO de los cultivos a 600 nm según se indica en Materiales y Métodos sección II.1.1. El signo + representa crecimiento normal, +/- crecimiento alterado, - no crecimiento. El mutante en el gen *Smc03113* representa un control de las condiciones ensayadas (ver texto).

En esta sección presentaremos los resultados obtenidos en ensayos de competición por la nodulación realizados para un conjunto de 5 mutantes con $M^{STM} < -1$, además del mutante en el gen *Smc03113* ($M^{STM} = 0,14$) que usamos como control. Empleando un sistema de plantas en macetas con vermiculita y solución de Fåhraeus (similar al utilizado para estudiar colonización), se inocularon mezclas de cada uno de los mutantes con la cepa salvaje 2011 MP6 (*gfp-Tc^R*) (Pistorio, *et al.*, 2002) conteniendo aproximadamente $0,5 \times 10^5$ u.f.c./ml de cada una de las cepas. Un mes después de la inoculación se analizó el porcentaje de nódulos ocupados por los mutantes, y por la cepa salvaje en cada uno de los ensayos. Los resultados obtenidos, que se presentan en la Tabla VII.1., muestran que a excepción del control todos los mutantes estudiados resultaron afectados en su competitividad por la ocupación de nódulos en diferente medida; y que mayores grados de afección se correspondieron con valores más negativos de M^{STM} . Estas observaciones confirman un rol importante de la colonización (pre-infección) en definir qué rizobios ocuparán los nódulos radiculares, mostrando además correspondencia entre capacidad colonizadora y la ocupación de nódulos.

Tabla VII. 1. Competitividad por la ocupación de nódulos en alfalfa de mutantes de *S. meliloti* afectados en la colonización radicular frente a la cepa salvaje.

Mutante	Gen afectado	Función	Valor M *	Número de nódulos analizados	% de ocupación del mutante promedio
2011mTn5STM.1.01.E07	Smc03113	transposasa - mutante M=0	0,14	18	50
2011mTn5STM.4.13.E11	Smb20529	proteína hipotética	-1,27	35	26,5
2011mTn5STM.3.01.G12	Smc04242	componente periplasmático del transportador de zinc de alta afinidad del tipo ABC - <i>znuA</i>	-1,61	20	19,8
2011mTn5STM.4.13.E02	SMc00775	posible permeasa de hierro (III) - <i>fbpB</i>	-1,77	24	17,1
2011mTn5STM.1.07.F11	Smc00488	Fosforribosil glicinamida sintetasa II - <i>purl</i>	-2,41	21	ND
2011mTn5STM.3.07.B02	Smc00963	proteína hipotética	-4,40	31	ND

Para los mutantes seleccionados se evaluó el porcentaje de ocupación de nódulos formados en raíces de alfalfa utilizando un sistema de cultivo de plantas similar al utilizado para los ensayos de STM. El porcentaje de ocupación de nódulos fue calculado como el promedio de 2 o 3 macetas independientes.

*En los casos de genes afectados por más de una inserción se utilizó el valor M^{STM} promedio obtenido para todos los mutantes que afectaron ese gen. ND: No se encontraron nódulos ocupados por el mutante, % de ocupación no detectable.

VII.5. Búsqueda de marcadores genéticos de *S. meliloti* asociados preferencialmente a la colonización de raíces de su planta hospedadora alfalfa.

Una de las características distintivas de las asociaciones entre rizobios y leguminosas es su alto grado de especificidad en relación al par rizobio-hospedador que es capaz de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno (Perret, *et al.*, 2000, Wang, *et al.*, 2012). Si bien existen algunas leguminosas que son noduladas por más de un rizobio (Michiels, *et al.*, 1998), y viceversa (Pueppke & Broughton, 1999), existe en general un alto grado de especificidad en la relación entre simbiosis. La molécula más estudiada en relación a la capacidad de un rizobio de asociarse con su planta hospedadora ha sido el factor Nod, y más recientemente sus receptores (y moléculas intracelulares de señalización) en las células de la raíz (Dénarié, *et al.*, 1996, Radutoiu, *et al.*, 2003). Es además bien sabido que otras moléculas, como algunos polisacáridos de superficie de los rizobios y lectinas en la

planta, son también necesarios para que una interacción curse de modo normal en un par simbiótico dado (Downie, 2010). Más allá de estos ejemplos referidos a moléculas implicadas en distintos estadios del desarrollo de la simbiosis, poco se conoce sobre la existencia de expresiones de especificidad durante la colonización rizosférica propiamente dicha.

Para abordar la búsqueda de determinantes genéticos asociados preferencialmente a la colonización de alfalfa y no de otras raíces, realizamos un estudio de STM-secuenciación como el presentado en el capítulo anterior pero empleando raíces de arveja (*Pisum sativum*), como planta heteróloga. Dado el mayor tamaño de las raíces de arveja y la posibilidad derivada de ello de recuperar un mayor número de bacterias de cada raíz, analizamos en este caso la población de rizobios LA y FA. Para obtener un mayor grado de seguridad en la selección de mutantes asociados a efectos específicos, la selección de mutantes se realizó considerando de manera estricta la condición de colonización de la planta hospedadora homóloga (usamos en este caso $M^{STM} < -1$ para *S. meliloti* colonizando alfalfa), descartando de la lista obtenida aquellos mutantes que también eran deficientes para colonizar arveja (en este caso con $M^{STM} < -0,7$ para colonizar arveja, una condición algo menos estricta que la exigida en alfalfa para admitir la deficiencia en colonización). Con los criterios anteriores se buscó seguridad en la selección de mutantes que efectivamente sean deficientes en alfalfa, sin deficiencias (o con deficiencias en menor grado, $M > -0,7$) para la colonización de raíces de arveja. En la Tabla VII.2. puede apreciarse que, con el criterio anterior, 28 mutantes que resultaron afectados en la colonización de alfalfa parecen no estar afectados (al menos tan significativamente) en la colonización de raíces de arveja. Dichos mutantes correspondieron al menos a 23 genes diferentes (las inserciones de 5 mutantes no fueron aún mapeadas). Llamativamente, de los genes que pudieron ser mapeados, menos de 20% se localizaron en los megaplásmidos simbióticos. A partir de esta observación no debe por tanto descartarse que la capacidad fijadora de nitrógeno en *S. meliloti* –codificada principalmente en el pSymA y pSymB– haya sido adquirida por una bacteria que ya expresaba preferencia en la colonización de raíces de alfalfa a través de su información cromosomal. Respecto de las funciones cabe mencionar que cerca de un tercio de los genes (35%) correspondieron a funciones relacionadas con transporte y metabolismo de aminoácidos, y un cuarto del total (26%) a genes vinculados a la movilidad y quimiotaxis bacteriana. Esta última observación sugiere la presencia de efectos asociados a la movilidad (posiblemente ligados a una quimioatracción específica) que son relevantes para el abordaje de una raíz y no (o en menor medida) de la otra.

Cuando buscamos por el contrario mutaciones en genes de *S. meliloti* que afectaran más la colonización de raíces de arveja que la de raíces de alfalfa (usando en este caso $M^{STM} < -1$ para seleccionar los mutantes afectados en la colonización de arveja, y $M < -0,7$ para excluir de la lista anterior los mutantes que están también afectados en la colonización de alfalfa) sólo identificamos 6 mutantes (Tabla VII.3.). La identificación de cerca de una treintena de mutantes especialmente afectados en la colonización de alfalfa, comparado con los sólo seis que tienen más afectada su colonización de arveja; son consistentes con la existencia de mecanismos específicos de colonización de la planta huésped que no operan en el mismo grado frente a una raíz heteróloga.

Tabla VII. 2. Mutantes de *S. meliloti* afectados preferencialmente en la colonización de raíces de alfalfa.

NS: Sitio de inserción no mapeado. El valor M^{STM} promedio fue calculado en base a los datos obtenidos para ese mutante a los 7 d.p.i. si es que el mutante se encontraba afectado en esa condición, si ese mutante se encontró afectado sólo a 3 d.p.i el valor M^{STM} corresponde al promedio de los obtenidos en esa condición.

Mutante	Replicón	ID	M^{STM} prom	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	Encontrado en Alf
2011mTn5STM.3.08.B06	NS		-5,12				3 d.p.i.
2011mTn5STM.2.01.D04	cromosoma	SMc02165	-4,56	<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	Nucleotide transport and metabolism	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.5.02.F01	cromosoma	SMc00235	-4,50	<i>trpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	Amino acid transport and metabolism	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.1.14.D09	cromosoma	SMc00236	-3,91	<i>trpC</i>	indole-3-glycerol-phosphate synthase	Amino acid transport and metabolism	3 d.p.i.
2011mTn5STM.4.07.C10	cromosoma	SMc01578	-3,40	<i>aatA</i>	aspartate aminotransferase	Amino acid transport and metabolism	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.1.05.E03	NS		-1,84				7 d.p.i.
2011mTn5STM.4.11.A02	cromosoma	SMc04038	-1,79		putative partial transposase for ISRM17 protein	Replication, recombination and repair	7 d.p.i.
2011mTn5STM.4.09.B10	cromosoma	SMc04333	-1,75		hypothetical protein	Not in cogs	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.3.03.H11	cromosoma	SMc02707	-1,75		hypothetical protein	general prediction only	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.2.08.G07	pSymB	Smb21263	-1,73		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter permease protein	Amino acid transport and metabolism	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.1.05.E02	NS		-1,72				3 d.p.i.
2011mTn5STM.5.10.G01	cromosoma	SMc00294	-1,64		aminotransferase	Amino acid transport and metabolism	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.4.06.A12	cromosoma	Smc03030	-1,50	<i>flgG</i>	flagellar basal body rod protein FlgG	cell motility	3 d.p.i.
2011mTn5STM.4.03.D12	cromosoma	SMc03313	-1,46		transposase ISRM11/ISRM2011-2	Replication, recombination and repair	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.2.06.G03	cromosoma	SMc03044	-1,40	<i>motD</i>	chemotaxis protein (motility protein D)	cell motility	3 d.p.i.
2011mTn5STM.3.13.G06	pSymB	Smb20652	-1,40	<i>asnB</i>	putative asparagine synthetase protein	Amino acid transport and metabolism	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.1.08.D01	cromosoma	SMc03027	-1,30	<i>flgB</i>	flagellar basal body rod protein FlgB	cell motility	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.2.04.E04	cromosoma	SMc00406	-1,20		4FE-4S ferredoxin iron-sulfur binding-domain containing protein	Energy production and conversion	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.4.12.C09	cromosoma	SMc00726	-1,19	<i>tlpA</i>	putative thiol:disulfide interchange redox-active center transmembrane protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.2.11.B08	NS		-1,18				7 d.p.i.
2011mTn5STM.3.11.D06	cromosoma	SMc03032	-1,15	<i>flgl</i>	flagellar basal body P-ring protein	cell motility	7 d.p.i.
2011mTn5STM.3.10.D06	cromosoma	SMc02611	-1,10	<i>glxC</i>	putative oxidoreductase protein	Amino acid transport and metabolism	7 d.p.i.
2011mTn5STM.4.03.B12	cromosoma	SMc03019	-1,08	<i>flgG</i>	flagellar motor switch protein G	cell motility	3 d.p.i.
2011mTn5STM.4.12.C04	pSymA	SMa1465	-1,08		putative ABC transporter permease	Amino acid transport and metabolism	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.1.09.F01	pSymB	Smb20724	-1,07		hypothetical protein	Function unknown	7 d.p.i.
2011mTn5STM.5.04.C03	NS		-1,04				7 d.p.i.
2011mTn5STM.2.09.A02	cromosoma	SMc02109	-1,03	<i>clpA</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	7 y 3 d.p.i.
2011mTn5STM.3.13.C01	cromosoma	SMc03008	-1,00	<i>cheW1</i>	chemotaxis protein	cell motility	7 d.p.i.

Tabla VII. 3. Mutantes de *S. meliloti* afectados preferencialmente en la colonización de raíces de arveja.

NS: Sitio de inserción no mapeado. El valor M^{STM} promedio fue calculado en base a los datos obtenidos para ese mutante en los ensayos indicados en la última columna

Mutante	Replicón	ID	M^{STM} prom	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	Encontrado en Av
2011mTn5STM.3.06.H10	cromosoma	SMc00043	-2,48		superoxide dismutase Fe protein	Inorganic ion transport and metabolism	Av FA
2011mTn5STM.4.06.B09	NS		-1,39				Av FA
2011mTn5STM.3.11.B02	pSymA	intergénico	-1,33		SMa_ORF_27		Av LA
2011mTn5STM.4.09.D02	cromosoma	SMc00234	-1,14		putative peptidyl-prolyl cis-trans isomerase protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Av LA
2011mTn5STM.3.10.C08	cromosoma	SMc02050	-1,07	tig	trigger factor	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Av FA
2011mTn5STM.2.03.B08	cromosoma	SMc02227	-1,01	fadB	putative fatty oxidation complex alpha subunit	Lipid transport and metabolism	Av LA

Con el objetivo de conocer si efectivamente existen genes preferencialmente asociados a la colonización de alfalfa, evaluamos: a) el comportamiento del mutante *Smc03014-fljF* afectado en la colonización de alfalfa pero no afectado en arveja ($M^{\text{alfalfa}} = -0,91$; con $M \approx 0$ en arveja), b) el mutante *Smc03047-flgE* afectado en la colonización tanto de alfalfa como de arveja ($M^{\text{alfalfa}} = -1,52$, $M^{\text{arveja}} = -0,5$) y que por tanto no se trata de un gen con sesgo marcado de especificidad, y c) el mutante *Smc03113* sin afección evidente en la colonización de raíces ($M^{\text{alfalfa/arveja}} \approx 0$) que fue utilizado como control. Los resultados que se presentan en la Figura VII.4. muestran que mientras el mutante *Smc03047-flgE* presenta un grado de afección importante en la colonización de ambas raíces, el mutante *Smc03014-fljF* está significativamente más afectado en alfalfa. El mutante control mostró en ambas plantas un comportamiento comparable al de la cepa salvaje. El ensayo con los tres mutantes anteriores valida nuevamente la correlación entre las predicciones del parámetro M^{STM} y el comportamiento de colonización evaluado por plaqueo, y muestra la existencia de genes relevantes para la colonización específica de ciertas raíces.

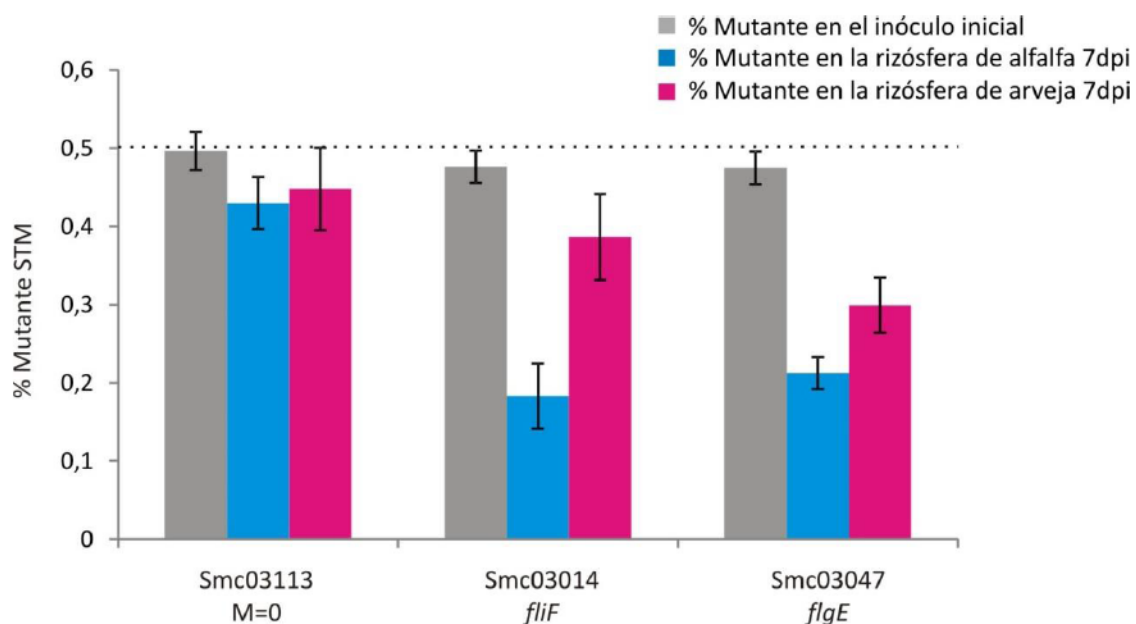


Figura VII. 4. Colonización de raíces de alfalfa y arveja por parte de mutantes seleccionados por STM-secuenciación para evaluar efectos específicos durante la colonización del hospedador homólogo.

Los mutantes *fliF* y *flgE* fueron co-inoculados junto a la cepa salvaje *S. meliloti* 2011 MP6 (*gfp*) (aprox. $0,5 \times 10^5$ u.f.c./ml de cada uno de los rizobios) sobre raíces de alfalfa y de arveja para estudiar sus propiedades de colonización a los 7 d.p.i. El porcentaje de mutante asociado a la rizósfera (población LA) respecto del presente en el inóculo inicial fue estimado por plaqueo. Las bacterias salvajes se distinguieron por su fluorescencia verde de GFP bajo iluminación de luz azul. Las barras de la figura corresponden al error estándar de la media.

VII.6. Marcadores genéticos de *S. meliloti* asociados a la colonización firme. Comparación de muestras LA y FA.

En el capítulo IV hemos diseñado un esquema de desafío que incluye condiciones de experimentación para evaluar la posible presencia de marcadores genéticos que puedan encontrarse afectados en la colonización firme del rizoplano en las etapas más tardías (7 d.p.i.). Hemos también

mencionado en el capítulo IV que las muestras de ADN provenientes de la colonización firme de alfalfa contenían un número de genomas insuficiente para garantizar la representatividad de todos los mutantes motivo por el cual, finalmente, los productos de amplificación provenientes de estas muestras no fueron consideradas para la generación de la mezcla de secuenciamiento. En estas condiciones las únicas muestras válidas para poder distinguir posibles efectos asociados a la colonización firme resultaron las provenientes de arveja. Utilizando un criterio estricto similar al que fue aplicado para la búsqueda de genes asociados preferencialmente a la colonización de distintas leguminosas, buscamos mutantes afectados en la colonización firme que no se encontraron afectados en la colonización laxa de ninguna de las dos leguminosas estudiadas. Tal análisis nos permitió identificar **sólo 3 mutantes asociados a la colonización firme de raíces de arveja**. De estos tres mutantes, sólo es conocido el sitio de inserción de dos de ellos, correspondiéndose con los genes *Smc00043* y *Smc02050*. El gen *Smc00043* codifica una superóxido dismutasa (Sod) posiblemente involucrada en el estrés oxidativo (Barloy-Hubler, *et al.*, 2004) y el gen *Smc02050* una chaperona (Vriezen, *et al.*, 2007). Análisis del proteoma de *S. meliloti* ha revelado que ambas proteínas se encuentran expresadas en nódulos (Djordjevic, 2004). No hemos aún realizado experimentos para confirmar el rol de estos mutantes en la adhesión firme.

La adaptación de un microorganismo a un ambiente particular es un proceso que requiere la regulación coordinada espacial y temporal de distintos genes. Tal regulación ocurre en respuesta a estímulos particulares, debiendo además compatibilizarse con las respuestas a otros estímulos que operan en el mismo nicho. Así, los rizobios que viven en el ambiente suelo y se asocian con plantas, deben coordinar su comportamiento en la vida libre con sus respuestas simbióticas tempranas al abordar la raíz hospedadora. En la transición de la vida saprofítica a la simbiótica los rizobios reconocen señales del hospedador y responden en consecuencia con modificaciones bioquímicas, metabólicas, y también morfológicas. Tal proceso de interacción comienza muy tempranamente antes del contacto físico, durante el abordaje rizosférico por parte de los rizobios.

En el capítulo anterior hemos identificado más de 100 genes/regiones génicas del *S. meliloti* que son relevantes para la colonización de la rizósfera de su planta huésped, alfalfa. En este capítulo hemos ensayado algunos de los mutantes identificados en diferentes condiciones de crecimiento. Algunos de estos mutantes estudiados demostraron encontrarse afectados en su metabolismo más básico (como era esperable), otros demostraron alteraciones en el crecimiento en medio definido sugiriendo la incapacidad de sintetizar en el medio rizosférico componentes importantes para abordar la raíz, y otros mutantes sólo mostraron comportamiento anómalo en exudados radiculares poniendo en evidencia genes posiblemente especializados en el reconocimiento (y uso) de productos de exudación radicular. No debe descartarse tampoco que genes con esas características puedan estar asociados a la detoxificación de componentes liberados por la raíz.

Más allá de las razones por las que los mutantes expresaron deficiencias fenotípicas durante la colonización de raíces, resultó interesante que una veintena de genes mostraron impactar

preferencialmente sobre la colonización de la planta hospedadora pero no la de la leguminosa heteróloga que utilizamos como control (arveja). Esta observación pone de manifiesto la expresión de una especificidad muy temprana que va más allá del reconocimiento de flavonoides asociado a la señalización por factores Nod, extensamente caracterizada.

Resulta además destacable que cinco mutantes afectados en colonización temprana demostraron una alteración paralela en la competitividad por la ocupación de los nódulos maduros; observación que sugiere muy fuertemente el rol determinante del abordaje temprano de la rizósfera en la definición de cuáles serán los genotipos que se establecerán más tardíamente en el espacio simbiótico disponible.

Las transposiciones que mejoraron los índices de colonización las hemos considerado con precaución en esta instancia. Por un lado observamos que no se superaron valores de M mucho mayores que la unidad (positivos). Podría ocurrir que la colonización ha sido muy optimizada a lo largo de la evolución y que por tanto es difícil encontrar cambios (mutaciones) que mejoren en una proporción grande la eficiencia de la misma. Observamos además que varios de los mutantes con $M > 0$ presentaron morfologías de colonia algo más grande que la cepa salvaje, con tiempos de duplicación más cortos (aprox. 10%) en medio líquido (similar a las curvas de crecimiento mostradas para el mutante positivo analizado en el Capítulo V.3. Si bien puede pensarse que diferentes mutaciones independientes (en los distintos mutantes) pueden ser causa de cambios hacia una mayor velocidad de crecimiento en esas cepas, también debe contemplarse la posibilidad de que exista alguna zona genómica caliente para la mutación espontánea, que sea la responsable del origen de los cambios fenotípicos observados en todos los mutantes. Por esta razón tomamos con precaución los cambios positivos observados en colonización. Para evaluar la posible existencia de mutaciones que derivan en efectos positivos en ese entorno, se deberán realizar transducciones de las inserciones de los mutantes en la cepa salvaje, y evaluar si se transfiere al mismo tiempo el fenotipo positivo de colonización junto con el mini-Tn5.

Con la información que hemos colectado, podrán iniciarse estudios que nos acerquen a las bases bioquímicas de la colonización, investigando: a) las conexiones entre genes de movilidad y colonización específica, b) el tipo de componentes de los exudados que correlacionan con la necesidad de determinantes genéticos específicos, y c) en general la asociación entre cada una de las mutaciones y las funciones alteradas en el rizobio que redundan en una inadecuada respuesta frente a la presencia de la planta.

Capítulo VIII

**Conclusiones finales,
perspectivas.**

El carácter oligotrófico de muchos suelos, y la consecuente competencia de los microorganismos por nutrientes, hace que los mismos evolucionen hacia el desarrollo de mejores capacidades de acceso a las fuentes naturales de sustratos. Por esta razón, la construcción de mejores estrategias de búsqueda y uso de recursos (nutritivos), es un mecanismo central usado por los microorganismos para mejorar sus posibilidades de supervivencia frente al resto de la biota acompañante. En un escenario como este, el ambiente rizosférico a lo largo de los distintos horizontes del suelo representa para los microorganismos un lugar de bonanza nutricional (Vacheron, *et al.*, 2013), y el rápido acceso al mismo es considerado un factor central en la competencia por el uso de recursos. La vida rizosférica no sólo ha servido como fuente de nutrientes para los microorganismos, sino que –como ámbito de relación (De-la-Pena & Loyola-Vargas, 2014)– ha sido el espacio de desarrollo de asociaciones más complejas con las plantas para beneficio mutuo como lo son la vida endofítica de diversas bacterias (Brader, *et al.*, 2014), y la vida simbiótica de los rizobios.

En nuestro laboratorio existe desde hace tiempo interés especial en caracterizar eventos tempranos de las asociaciones entre rizobios y plantas, **con el propósito particular de comprender los mecanismos bioquímicos moleculares que median las primeras etapas de contacto químico y físico entre las bacterias y las raíces** (estudios de componentes superficiales y secretados de uno y otro participante, adhesión, etc.). Las aproximaciones experimentales utilizadas históricamente en distintos laboratorios han estado centradas esencialmente en la caracterización de componentes particulares de los simbioses y sus actividades (polisacáridos, proteínas, componentes de bajo peso molecular, lectinas, etc.); o en el análisis de mutantes afectados en genes específicos para investigar el rol de cada uno de ellos en el progreso de la simbiosis. Estas aproximaciones han servido para conocer el rol de diferentes moléculas durante la interacción biológica, y para encontrar nuevos componentes relevantes para la asociación a partir de las deficiencias observadas en algunos mutantes. El uso de métodos ómicos ha sido mucho más reciente (ver introducción de esta tesis), habiéndose aplicado mayoritariamente al estudio de etapas tardías de la simbiosis (nodulación) (Pobigaylo, *et al.*, 2006, Pobigaylo, *et al.*, 2008), y con énfasis en estudios de expresión (transcriptómicos/proteómicos) en uno y otro simbiote bajo situaciones particulares de interés (Ruberg, *et al.*, 2003, Becker, *et al.*, 2004, Capela, *et al.*, 2006, Biondi, *et al.*, 2009, Hellweg, *et al.*, 2009, Schluter, *et al.*, 2010, Moreau, *et al.*, 2011, Cabeza, *et al.*, 2014). **En este trabajo de tesis hemos abordado el desarrollo y uso de nuevos métodos moleculares para la identificación (a escala genómica) de genes vinculados a la colonización radicular temprana por parte de rizobios, atento al rol de dicho proceso durante el diálogo temprano y la selección del tipo de cepas que ocuparán el espacio simbiótico tardío (nódulos en fijación activa).**

En el primer capítulo hemos construido nuevas herramientas RIVET para la búsqueda de genes inducidos en los rizobios en condiciones específicas (ej. presencia de exudados radiculares, entorno de la raíz, contacto con la misma, etc.). El interés de emplear herramientas RIVET para el estudio de los eventos simbióticos tempranos deriva de la potencia de la misma para identificar inducciones génicas en nichos de difícil acceso (rizósfera, rizoplano), y aun inducciones transientes, con ayuda de una trampa de promotores y un módulo indicador (Angelichio & Camilli, 2002, Osorio,

et al., 2005). La herramienta –transposicional- que hemos desarrollado permite construir fusiones transcripcionales de la recombinasa *tnpR* con genes del rizobio (al azar), sin la necesidad de construir bibliotecas de fusión en sistemas plasmídicos (Capítulo III). Lamentablemente, la frecuencia de transposición del mini-Tn5 que construimos no alcanzó niveles lo suficientemente altos como para generar (en un tiempo y número de ensayos razonable) un número de fusiones independientes que garantice una buena cobertura de inserciones a escala genómica (miles, a decenas de miles de fusiones teniendo en cuenta que *S. meliloti* porta más de seis mil genes). De todos modos, la nueva herramienta podrá ser utilizada para estudios RIVET en otras especies y géneros bacterianos donde la frecuencia de transposición del mini-Tn5 resulte mayor. Derivado de la limitación mencionada para el uso de nuestra herramienta transposicional en *S. meliloti*, durante el desarrollo de esta tesis otros miembros del laboratorio han ya preparado una biblioteca de más de diez mil fusiones genómicas a *tnpR* empleando un sistema plasmídico construido previamente en nuestro laboratorio, pRIVET-I (Lozano, *et al.*, 2011). Con dicho sistema ya hemos identificado genes inducidos tempranamente en simbiosis por la presencia de la raíz de alfalfa o de sus productos de secreción (Dr. Mauricio Lozano, trabajo en curso). Dicho análisis enfocado en un *screening* transcriptómico temprano, complementa al que hemos presentado en esta tesis basado en la selección de genes del rizobio cuya alteración resulta en cambios fenotípicos durante la simbiosis temprana.

En los Capítulos IV a VII de este trabajo nos concentramos en el diseño, puesta a punto, y aplicación de tecnologías STM aplicadas al análisis de la colonización rizosférica. Hemos discutido en detalle la importancia de estudiar los efectos en concentraciones de rizobios que emulen las existentes en el entorno de la raíz de modo que se preserven eventuales respuestas específicas de *quórum* generadas por moléculas de los propios rizobios. Según mencionamos, como primera aproximación y por razones de simplicidad, hemos obviado el uso de la matriz suelo con su flora acompañante. De todos modos, en el entorno radicular que operó en nuestros ensayos ha existido una abundante flora acompañante de los rizobios inoculados. Estudios recientes de nuestro grupo muestran la presencia de más de una veintena de géneros bacterianos diferentes en el interior de las semillas de alfalfa, los que luego se transforman en pobladores (exófitos y endófitos) de la raíz de las plántulas en crecimiento (Lic. José. L. López, tesis en redacción). En la primera fase del trabajo, que describimos en detalle en el Capítulo IV, nos concentramos en definir las condiciones experimentales del ensayo, atendiendo en particular a: **a)** la cantidad de rizobios inoculados (cantidad total) tratando de emular los números existentes naturalmente en suelos, **b)** el número de mutantes diferentes contenidos en dicho inóculo para garantizar la representatividad (estadísticamente hablando) de cada uno de ellos al inicio del ensayo, **c)** el número total de bacterias que podían ser recuperadas de las raíces al final del experimento (para garantizar también al final del ensayo la representatividad de toda la diversidad inoculada), **d)** el número de genomas que podían extraerse de las bacterias recuperadas (eficiencia de la preparación de ADN), **e)** la amplificación adecuada por PCR de dichos genomas, **f)** el marcaje de los productos para su identificación inequívoca por secuenciación (condición analizada-réplica-número de mezcla-mutante específico), **g)** la secuenciación de los productos de PCR con una tecnología que provea un número de lecturas que garantice la representatividad de todas los tipos de moléculas presentes, y finalmente, **h)** la necesidad de

desarrollar herramientas informáticas para: el contaje inequívoco de secuencias específicas, el análisis estadístico de las mismas, y para el cálculo final de los parámetros M como indicadores del comportamiento de cada mutante en colonización respecto a la cepa salvaje (según indicamos utilizamos un programa desarrollado en lenguaje C para los recuentos de firmas, y macros de Excel para el análisis final de los datos). El ajuste de las variables anteriores y el desarrollo de las herramientas mencionadas constituyeron actividades imprescindibles para garantizar la aplicabilidad de la tecnología STM a los estudios de colonización bajo las condiciones que deseamos estudiar.

El análisis de mutantes con el sistema de cuantificación de firmas en micrarreglos (Capítulo V), y luego también el realizado por secuenciamiento (Capítulo VI); mostraron ambos que las condiciones experimentales (concentraciones de bacterias, tiempos de colonización, extracciones de ADN y amplificaciones, cuantificación de firmas por cualquiera de los métodos empleados) fueron adecuadas para identificar genes asociados a la colonización, según lo confirmaron los ensayos de validación de varios mutantes presentados en los capítulos V (Figura V.5) y VII (Figura VII.1). Además, varios de los mutantes identificados por una y otra metodología fueron coincidentes (Capítulo VI, Tabla VI.1 y VI.2). A partir del ensayo piloto del Capítulo V empleando STM-secuenciamiento, extendimos el análisis a escala genómica evaluando más de seis mil mutantes según mostramos en el Capítulo VI. Hasta el momento, el número de mutantes y condiciones analizables por STM había estado siempre limitado por las restricciones que impone tanto la necesidad de contar con un microarreglo ya establecido para el sistema particular de firmas que se estudia, como por el número de microarreglos necesarios para realizar el análisis cuantitativo de firmas. Los experimentos que presentamos en este trabajo constituyen el primer uso de STM acoplado a una técnica de secuenciamiento de alta capacidad, habiendo permitido estudiar diversas condiciones diferentes con quince mezclas de mutantes, en todos los casos con cuatro réplicas biológicas/técnicas. Las condiciones que hemos empleado pueden ser además fácilmente escalables a las necesidades de otros diseños experimentales. En relación a los resultados, y desde el punto de vista cuantitativo, cabe destacar la muy buena correlación entre la estimación de grado de afección de los mutantes estimado por STM (M^{STM}) respecto del medido directamente por plaqueo de los rizobios ($M^{plaqueo}$). Derivado de esta observación hemos podido, basados en los valores de M, analizar el grado de afección relativo (de modo comparativo) entre los diferentes mutantes de interés que fueron identificados.

Los resultados obtenidos muestran claramente que la colonización temprana de las raíces de alfalfa por parte de *S. meliloti* implica la participación de al menos un centenar de genes/regiones genómicas del rizobio (Tablas Anexo I y Anexo II). Hemos observado que los grupos funcionales más representados entre esos genes corresponden a metabolismo y transporte de aminoácidos, a funciones de movilidad y quimiotaxis, con varios genes de función aún desconocida. Resultaron particularmente interesantes aquellos mutantes que mostraron crecimiento normal en los medios de cultivos (rico y mínimo) ensayados, pero que se encuentran afectados en su crecimiento (/persistencia/sobrevivencia) en exudados (ej. *Smc00963*, *Smc02407*, *Smc01143* entre sólo unos pocos ensayados) (Capítulo VII, sección VII.3. Grupo C de mutantes, Figura VII.3.). Los

resultados han mostrado por otra parte unos pocos genes que parecen afectar la colonización más tardía, a los 7 d.p.i.; sin ser reconocidos como afectados a los 3 d.p.i.. Habrá que verificar si las predicciones del experimento de STM-secuenciación son validadas para dichos mutantes, utilizando ensayos de doble inoculación con la cepa salvaje. Más allá de las consideraciones anteriores, hemos observado que los mutantes afectados en colonización que ensayamos en nodulación (5 mutantes) han resultado todos menos competitivos por la ocupación de nódulos que la cepa salvaje (Capítulo VII, Tabla VII.1.). Los resultados mostraron que el comportamiento durante las primeras instancias de la interacción con la planta es determinante en la definición de los genotipos que ocuparán el nicho simbiótico. Desde el punto de vista práctico, los resultados obtenidos muestran a las etapas involucradas en la colonización temprana de raíces como puntos de evaluación importante en programas de selección de mejores cepas inoculantes entre los genotipos más eficientes.

Un aspecto de especial interés que no había sido explorado con las herramientas que aquí hemos utilizado, es la búsqueda de posibles efectos específicos asociados a la colonización de raíces de alfalfa por *S. meliloti* (que no se expresen durante la colonización de una raíz heteróloga). La comparación de los mutantes afectados en ensayos de STM empleando, por separado, raíces de plantas alfalfa o de arveja; permitió identificar más de una veintena de inserciones que sólo afectaron (con marcada preferencia) la colonización de las raíces de alfalfa. Como antecedente de un fenómeno de especificidad temprana durante la interacción de *S. meliloti* con alfalfa se destaca el reporte del efecto estimulador de exudados radiculares de alfalfa sobre la unión de los rizobios homólogos al rizopiano (Wall & Favelukes, 1991). Resultó además interesante que –a la inversa– la búsqueda de mutantes afectados sólo en arveja (la planta heteróloga) condujo a la identificación de sólo 5 genes, marcando una diferencia muy significativa en la cantidad de información que el rizobio dedica al abordaje eficiente de su propio hospedador. A partir de estos resultados podremos investigar las bases moleculares de la especificidad temprana, particularmente si se debe a efectos quimiotácticos sólo inducidos (o inducidos preferencialmente) por la raíz de alfalfa, o a la capacidad de utilizar elementos/compuestos más abundantes en el entorno radicular de esta planta.

Un aspecto particularmente interesante es el referido a la localización genómica mayoritariamente cromosomal de los genes asociados a efectos de especificidad hacia la raíz de alfalfa. Si bien en otros rizobios se ha reportado la importancia de información extracromosomal en la capacidad colonizadora de las bacterias (ej. el plásmido pRL8 en *R. leguminosarum* bv. *viciae*) (Ramachandran, *et al.*, 2011), la centralización de funciones tempranas en el cromosoma como ocurre en *S. meliloti* no condiciona la colonización sólo a genotipos portadores de plásmidos accesorios particulares. La localización preferencialmente cromosomal que hemos observado para los genes de especificidad en *S. meliloti*, sugiere además muy fuertemente la posibilidad de que las características simbióticas tardías asociadas a la infección (codificadas esencialmente en los pSyms) hayan sido adquiridas (horizontalmente) en el entorno radicular de una *Medicago* spp. (u otro género relacionado) por una bacteria previamente adaptada a ese entorno rizosférico. En la simbiosis entre *Lotus corniculatus* y mesorhizobios ya se han observado fenómenos de especiación en los que una isla simbiótica (cromosomal en ese caso) era transferida a miembros no-simbióticos de la propia flora rizosférica de *Lotus* (“no rizobios”) generando una diversidad importante de “nuevos rizobios” a

partir de la población que ya colonizaba el hospedador (Sullivan, *et al.*, 1995, Sullivan, *et al.*, 1996, Sullivan & Ronson, 1998). Si bien la verificación a campo de un mecanismo similar para los simbioses de *Medicago* spp. es compleja, los resultados que hemos obtenido en relación a la genética y capacidades de colonización radicular en *S. meliloti* son consistentes con un mecanismo como el observado para el par mesorizobios-*Lotus*. Ligado a las consideraciones anteriores podrá investigarse si los efectos observados en alfalfa son operativos en otras plantas hospedadoras de *S. meliloti* como especies de los géneros *Melilotus* y *Trigonella*, y si están ausentes (o son menos pronunciados) en leguminosas heterólogas y en plantas no-leguminosas. Reportes recientes (empleando herramientas transcripcionales) han mostrado que puede existir especificidad de planta huésped (Ramachandran, *et al.*, 2011, Turner, *et al.*, 2013) (esto es, plantas con sus microbiomas característicos) y también cambios en la microflora radicular durante el desarrollo (de Campos, *et al.*, 2013), mostrando la existencia de microbiomas radiculares específicos en los que podrán buscarse las especies (y cepas) bacterianas con efectos positivos sobre las plantas que ellas colonizan (Vacheron, *et al.*, 2013). **El conjunto de evidencias colectado recientemente abre la posibilidad cierta de analizar el tipo de factores que favorecen la colonización de ambientes rizosféricos particulares por bacterias específicas, como primer paso hacia el direccionamiento racional de microorganismos con actividades de biocontrol y promotoras del crecimiento vegetal.**

En la Figura C1 se muestra un modelo de las posibles instancias que tienen lugar durante la comunicación inicial raíz-rizobio. El conocimiento disponible actualmente refiere a la planta como la iniciadora del diálogo simbiótico mediado por la secreción de flavonoides (parte A y B de la figura) (Oldroyd, 2013), compuestos que tienen además actividad en otras interacciones biológicas (Abdel-Lateif, *et al.*, 2012). No debe descartarse, por otra parte, que existan en simultáneo señales aún no identificadas dirigidas desde el rizobio a la raíz, previo a la percepción de productos de los exudados radiculares. En los recuadros C-D de la figura se indican en rojo las posibles etapas en las que podrían participar los distintos grupos de mutantes que hemos identificado (grupos A-D Capítulo VII, sección 3), siempre considerando que los fenómenos indicados (señalizaciones, quimiotaxis, crecimiento) deben considerarse con ocurrencia simultánea más allá de la preponderancia que pueda tener cada uno de ellos en cada etapa a lo largo de la colonización.

Con estudios como el aquí presentado esperamos comprender de modo más acabado las bases sobre las que los microorganismos exploran los entornos rizosféricos, y con preferencia los de determinadas especies vegetales, como **vía hacia el reconocimiento de las estrategias que modelan y definen la ecología de uno de los nichos nutricionalmente más ricos (eutróficos) del ambiente suelo.**

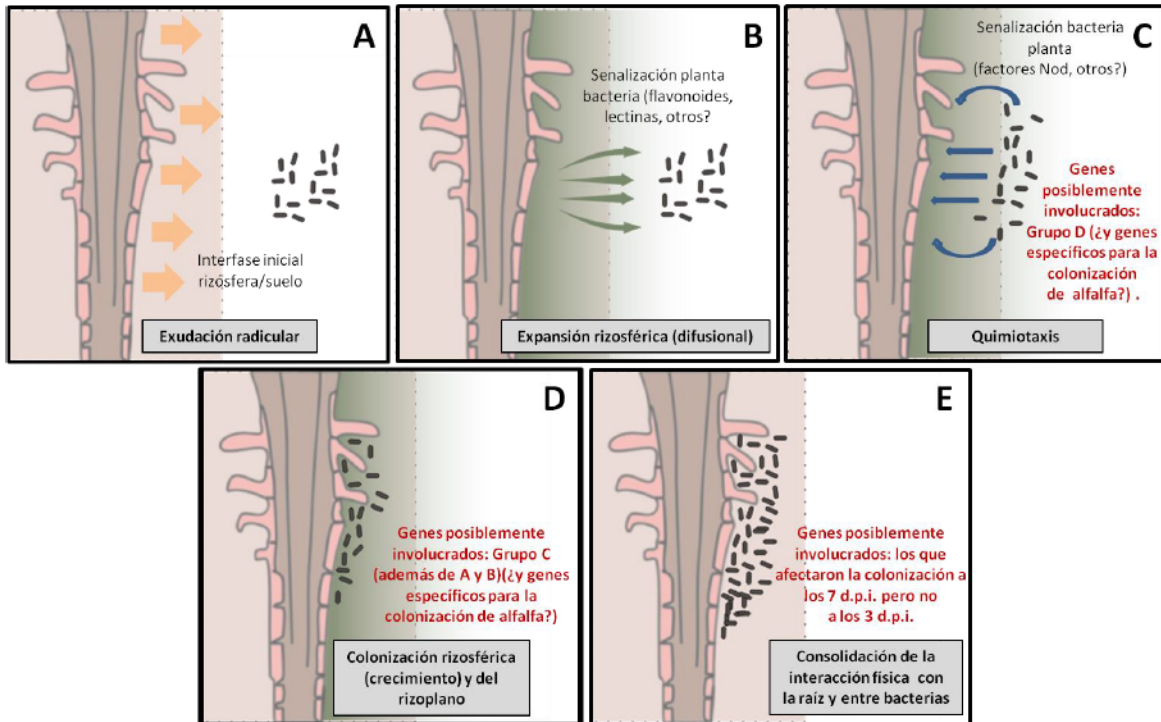


Figura C 1 Modelo del proceso de colonización de raíces de leguminosas por rizobios. Señales simbióticas tempranas previamente descritas, y posible localización de los efectos asociados a genes identificados en este trabajo de tesis.

A. Raíz y rizobios aislados del suelo fuera de la esfera de influencia de la planta. **B.** Difusión de los productos de exudación (y descamación) radicular ricos en C y N: expansión de la zona rizosférica. Señalización de la planta al rizobio (flavonoides, lectinas). Percepción de señales de la planta por parte de los rizobios. **C.** Quimiotaxis de las bacterias hacia la rizósfera (¿efectos específicos?). Señalización de los rizobios a la raíz (factores de nodulación, Nod). **D.** Establecimiento rizosférico de los rizobios. Contacto inicial, crecimiento. **E.** Crecimiento y establecimiento de interacciones tardías rizobio-planta y rizobio-rizobio. Los grupos de genes A-D y aquellos, los asociados a efectos específicos y los relevantes sólo al evaluar la colonización más tardía (7 d.p.i.) corresponden a los que fueron presentados en el Capítulo VII, sección VII.3. y VII.4..

La extensa colonización radicular de las plantas es un hecho conocido de larga data, y explorado cada vez más intensamente en el contexto de las potencialidades de biocontrol y biofertilización de muchas de las bacterias que conviven en la raíz. Los resultados de este trabajo de tesis han permitido acceder a la información genética asociada a la colonización radicular por una bacteria modelo de importancia agrícola, abriendo la posibilidad de explorar primero a nivel genético (búsqueda de ortólogos) y luego a nivel funcional el grado de ubiquidad -en otros géneros y especies- de los genes (y funciones) aquí identificadas.

Perspectivas.

En primer lugar con los datos disponibles se podrá (y deberá) abordar la validación fenotípica de muchos mutantes que en este trabajo aún no hemos analizado en ensayos de doble inoculación con la cepa salvaje (desde lo formal, además, deberá verificarse de modo claro la asociación entre cada una de las inserciones y los fenotipos observados (transducción, genética reversa)). Teniendo en cuenta la ocurrencia de efectos polares cuando se trata de operones afectados, deberá analizarse

cuál de los genes es el responsable de los cambios fenotípicos tempranos (deleciones en marco, otras estrategias). Transitados estos aspectos, se podrá poner sin duda especial atención a identificar las señales/sustratos que inducen respuestas con mayor sesgo de especificidad hacia *S. meliloti*, y las vías de transducción de las mismas/actividades metabólicas puestas en juego en los rizobios. Los avances en esta dirección permitirán identificar estrategias evolutivas primarias asociadas a los orígenes de la comunicación entre simbioses, y evaluar su ocurrencia en otras asociaciones planta-bacteria con distinto grado de cercanía evolutiva con propósitos básicos y aplicados (Zhang, *et al.*, 2015).

Anexos

Anexo I

AI. Tabla 1. Lista de mutantes de *S. meliloti* afectados negativamente en la colonización de rizósferas de plantas de alfalfa a los 3 d.p.i.

Los mutantes se encuentran ordenados por orden creciente de valor M promedio (promedio no mostrado). Los mutantes que sólo muestran valores asociados a la firma K o H sólo pudieron ser analizados por esa firma. NS: Mutante cuyo sitio de inserción no ha sido secuenciado. * Valor $p > 0,05$. La columna "inserciones" cuenta el número de veces que ese gen se encuentra repetido en la misma lista. La columna "7 d.p.i" indica el comportamiento de ese mutante en los experimentos de colonización de plantas de alfalfa 7 d.p.i. "SI" indica que ese mismo mutante se encontró afectado a los 7 d.p.i. "NO" indica que ese mutante no se encontró afectado a los 7 d.p.i.. "otra inserción" indica que ese mutante no fue encontrado afectado a los 7 d.p.i. pero si se encontró otro mutante afectado en el mismo gen. El producto génico y la categoría funcional fueron extraídos de la base de datos Rhizobase (Sección Materiales y métodos II.6). UR: Unidad repetitiva.

Alfalfa 3 d.p.i - Mutantes afectados negativamente

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserciones	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	7 d.p.i.
1	2011mTn5STM.4.09.F05	cromosoma	SMc04042	-6,22	2,6E-03	-5,28	1,3E-02	2		putative monophosphatase protein	Carbohydrate transport and metabolism	Otra inserción
2	2011mTn5STM.3.10.F05	cromosoma	SMc01431	-6,09	2,4E-04	-5,18	1,8E-05	2	<i>ilvI</i>	acetolactate synthase 3 catalytic subunit	Amino acid transport and metabolism	SI
3	2011mTn5STM.2.05.D01	cromosoma	SMc04026	-6,04	3,8E-06	-5,18	2,8E-05	1	<i>gltD</i>	glutamate synthase subunit beta	Amino acid transport and metabolism	SI
4	2011mTn5STM.1.05.A08	cromosoma	SMc04028	-6,21	3,7E-05	-5,00	8,4E-07	1		glutamate synthase NADPH large chain protein	Amino acid transport and metabolism	SI
5	2011mTn5STM.3.06.A07	NS		-6,21	1,7E-04	-4,96	9,2E-05					SI
6	2011mTn5STM.1.08.C11	cromosoma	SMc04346	-6,02	1,9E-04	-4,98	4,1E-05	4	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	amino acid transport and metabolism	SI
7	2011mTn5STM.3.08.B05	cromosoma	SMc00641	-6,16	1,7E-04	-4,45	4,3E-05	2	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Coenzyme transport and metabolism	SI
8	2011mTn5STM.4.06.H03	cromosoma	SMc01431	-5,14	5,4E-05			2		acetolactate synthase 3 catalytic subunit	Amino acid transport and metabolism	SI
9	2011mTn5STM.3.08.B06	NS		-5,03	2,2E-03	-5,20	1,7E-03					NO
10	2011mTn5STM.2.14.D07	NS		-5,27	5,5E-04	-4,87	3,8E-04					SI
11	2011mTn5STM.5.05.D01	cromosoma	SMc02717	-4,90	4,2E-05	-5,11	8,0E-05	1	<i>leuA1</i>	2-isopropylmalate synthase	not in cogs	SI
12	2011mTn5STM.5.07.H04	pSymB	Smb21555	-4,97	2,6E-04	-4,77	4,7E-05	1	<i>kefB2</i>	protein_coding_gene	Inorganic ion transport and metabolism	SI
13	2011mTn5STM.3.05.A06	cromosoma	SMc04346			-4,81	2,8E-05	4	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	Amino acid transport and metabolism	SI
14	2011mTn5STM.4.06.D02	cromosoma	SMc04346	-5,00	1,4E-03	-4,52	5,1E-04	4	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	Amino acid transport and metabolism	SI
15	2011mTn5STM.3.07.B02	cromosoma	SMc00963	-4,52	1,0E-04	-4,89	2,9E-04	2		hypothetical protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
16	2011mTn5STM.1.09.H12	cromosoma	SMc02767	-4,63	9,2E-06	-4,36	9,5E-05	1	<i>trpF</i>	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	Amino acid transport and metabolism	SI
17	2011mTn5STM.3.05.A05	cromosoma	SMc04045			-4,32	1,8E-03	1	<i>ilvD2</i>	dihydroxy-acid dehydratase	Amino acid transport and metabolism	SI
18	2011mTn5STM.1.03.D11	cromosoma	SMc04346	-5,02	3,0E-04	-3,52	8,2E-04	4	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	Amino acid transport and metabolism	SI
19	2011mTn5STM.4.12.C12	cromosoma	SMc04042	-4,93	4,2E-04	-3,47	2,9E-05	2		putative monophosphatase protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
20	2011mTn5STM.2.02.E07	cromosoma	SMc04405	-4,54	9,0E-04	-3,74	3,2E-04	1	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	Energy production and conversion	SI
21	2011mTn5STM.2.07.E03	cromosoma	SMc00963	-4,22	1,0E-03	-3,98	7,7E-05	2		hypothetical protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
22	2011mTn5STM.2.01.D04	cromosoma	SMc02165	-3,83	7,0E-05	-4,25	1,1E-03	1	<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	Nucleotide transport and metabolism	SI
23	2011mTn5STM.5.02.F01	cromosoma	SMc00235	-4,62	3,3E-03	-3,25	1,5E-04	1	<i>trpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
24	2011mTn5STM.1.14.D09	cromosoma	SMc00236	-4,37	2,2E-03	-3,45	2,0E-03	1	<i>trpC</i>	indole-3-glycerol-phosphate synthase	Amino acid transport and metabolism	NO
25	2011mTn5STM.1.05.A04	cromosoma	SMc04348	-3,69	9,5E-05	-3,98	1,7E-04	1		putative transcription regulator protein	transcription	SI
26	2011mTn5STM.4.06.D06	NS		-3,43	8,2E-06	-3,48	1,9E-04					SI
27	2011mTn5STM.3.03.G02	cromosoma	SmeIC094	-3,85	2,0E-04	-3,01	5,7E-04	1		probablemente afectando pyrC y E		SI
28	2011mTn5STM.2.06.A08	cromosoma	SMc03797	-3,38	2,4E-05	-3,45	7,0E-06	3	<i>metA</i>	homoserine O-succinyltransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
29	2011mTn5STM.4.07.C10	cromosoma	SMc01578	-3,63	5,1E-04	-3,18	6,6E-03	1	<i>aatA</i>	aspartate aminotransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
30	2011mTn5STM.2.10.D03	cromosoma	SMc00641	-3,39	1,8E-03	-3,11	8,0E-04	2	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Coenzyme transport and metabolism	SI
31	2011mTn5STM.3.01.B12	cromosoma	SMc03797	-3,42	4,5E-05	-2,90	2,1E-04	3	<i>metA</i>	homoserine O-succinyltransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
32	2011mTn5STM.1.13.H04	cromosoma	SMc02450	-2,20	2,8E-03	-3,90	1,5E-04	1	<i>argJ</i>	bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase protein	Not in cogs	Otra inserción
33	2011mTn5STM.1.02.C06	cromosoma	SMc02791	-3,38	2,7E-04	-2,69	2,7E-04	1	<i>aroE1</i>	shikimate 5-dehydrogenase	Amino acid transport and metabolism	SI

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserciones	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	7 d.p.i.
34	2011mTn5STM.4.09.F03	cromosoma	SMc03797	-3,12	1,2E-04	-2,81	2,0E-05	3	<i>metA</i>	homoserine O-succinyltransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
35	2011mTn5STM.2.04.A06	cromosoma	SMc00554	-2,88	9,5E-04	-2,86	1,4E-03	1	<i>purF</i>	amidophosphoribosyltransferase	Nucleotide transport and metabolism	SI
36	2011mTn5STM.3.13.H06	cromosoma	SMc02899	-3,43	1,3E-03	-1,86	1,2E-02	1	<i>pheA</i>	prephenate dehydratase	Amino acid transport and metabolism	SI
37	2011mTn5STM.4.02.D11	cromosoma	SMc01139	-2,74	3,4E-04	-2,35	4,3E-04	1	<i>rpoN</i>	RNA polymerase factor sigma-54	Transcription	SI
38	2011mTn5STM.1.01.E09	cromosoma	SmeIC100	-2,89	4,4E-04	-2,17	7,2E-04	1		probablemente afectando transcripción metZ		SI
39	2011mTn5STM.2.06.A11	cromosoma	SMc01042	-2,56	1,5E-03	-2,44	2,3E-04	1	<i>ntrB</i>	nitrogen regulation protein	Signal transduction mechanisms	SI
40	2011mTn5STM.1.07.F11	cromosoma	SMc00488	-2,34	9,1E-04	-2,48	4,8E-04	1	<i>purL</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	Nucleotide transport and metabolism	SI
41	2011mTn5STM.2.04.E06	cromosoma	SMc02123	-2,84	2,4E-03	-1,56	3,4E-02	2		hypothetical protein	function unknow	SI
42	2011mTn5STM.1.01.C09	cromosoma	SMc03883	-2,30	1,8E-06	-1,93	5,4E-04	1	<i>mtgA</i>	monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase	Cell wall/membrane biogenesis	SI
43	2011mTn5STM.4.02.E06	cromosoma	SMc02226	-2,17	6,4E-04	-1,87	7,6E-04	1		hypothetical protein	function unknow	SI
44	2011mTn5STM.4.09.A09	cromosoma	SMc02435	-1,89	4,3E-04	-1,99	7,4E-03	1	<i>hemK1</i>	putative methyltransferase protein	Translation	SI
45	2011mTn5STM.4.04.C12	cromosoma	SMc01053	-1,98	1,6E-03	-1,90	4,5E-03	1	<i>cysG</i>	siroheme synthase protein	Coenzyme transport and metabolism	SI
46	2011mTn5STM.4.10.B06	NS		-1,98	1,1E-03	-1,90	1,5E-03					SI
47	2011mTn5STM.4.07.A01	pSymB	Smb21262	-1,87	5,5E-03	-1,81	5,5E-03	3		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter permease protein	Amino acid transport and metabolism	SI
48	2011mTn5STM.4.13.E02	cromosoma	SMc00775	-2,07	8,1E-03	-1,48	3,9E-03	2	<i>fbpB</i>	putative IRON(III) permease protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
49	2011mTn5STM.3.01.H10	cromosoma	SMc00091	-1,76	1,5E-04			1		sulfate adenyltransferase subunit 2	Amino acid transport and metabolism	SI
50	2011mTn5STM.4.03.D12	cromosoma	SMc03313	-2,20	1,9E-03	-1,30	1,4E-02	1		transposase ISRM11/ISRM2011-2	Replication, recombination and repair	NO
51	2011mTn5STM.1.05.E02	NS		-1,88	2,5E-05	-1,56	8,6E-03					NO
52	2011mTn5STM.3.03.H11	cromosoma	SMc02707	-1,73	1,0E-05	-1,71	1,3E-02	1		hypothetical protein	general prediction only	SI
53	2011mTn5STM.4.14.G12	NS		-1,72	6,7E-04	-1,61	9,6E-05					SI
54	2011mTn5STM.3.09.H10	cromosoma	SMc00090	-1,61	3,3E-04			2	<i>cysN</i>	putative sulfate adenylate transferase cysteine biosynthesis protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
55	2011mTn5STM.3.01.G12	cromosoma	SMc04245	-1,72	1,9E-03	-1,50	6,7E-03	1	<i>znuA</i>	high-affinity zinc uptake system ABC transporter protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
56	2011mTn5STM.4.08.H09	cromosoma	SMc03004	-1,45	4,8E-03	-1,74	1,6E-03	2	<i>mcpE</i>	putative chemoreceptor (methyl-accepting chemotaxis protein)	cell motility	SI
57	2011mTn5STM.3.06.B12	cromosoma	SMc03007	-1,57	2,3E-03	-1,57	2,1E-03	6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI
58	2011mTn5STM.3.10.F09	cromosoma	SMc03005	-1,54	2,7E-03	-1,58	2,7E-03	1		hypothetical protein	Not in cogs	SI
59	2011mTn5STM.4.10.G11	cromosoma	SMc03004	-1,60	3,2E-03	-1,47	9,3E-04	2	<i>mcpE</i>	putative chemoreceptor (methyl-accepting chemotaxis protein)	cell motility	SI
60	2011mTn5STM.5.06.E01	pSymB	Smb21262	-1,55	6,9E-04	-1,52	2,7E-03	3		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter permease protein	Amino acid transport and metabolism	SI
61	2011mTn5STM.2.10.G05	cromosoma	SMc03140	-1,38	1,1E-03	-1,67	9,3E-05	2		putative transcription regulator protein	Transcription	SI
62	2011mTn5STM.4.14.A09	NS		-1,53	4,8E-04	-1,50	1,7E-03					SI
63	2011mTn5STM.4.06.A12	cromosoma	SMc03030	-1,38	3,8E-03	-1,62	1,9E-04	1	<i>flgG</i>	flagellar basal body rod protein FlgG	cell motility	NO

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserciones	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	7 d.p.i.
64	2011mTn5STM.5.12.A01	cromosoma	SMc03140	-1,46	9,6E-04	-1,52	2,1E-03	2		putative transcription regulator protein	Transcription	Otra inserción
65	2011mTn5STM.3.13.H11	cromosoma	Smc03007	-1,58	5,7E-03	-1,39	1,6E-03	6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI
66	2011mTn5STM.4.10.D03	cromosoma	Smc03007	-1,44	1,4E-02	-1,41	7,1E-02*	6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI
67	2011mTn5STM.2.06.G03	cromosoma	SMc03044	-1,30	1,2E-02	-1,50	3,7E-03	1	<i>motD</i>	chemotaxis protein (motility protein D)	cell motility	NO
68	2011mTn5STM.3.02.E03	cromosoma	SMc03007	-1,41	4,9E-02	-1,36	7,9E-03	6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI
69	2011mTn5STM.1.09.C10	pSymB	Smb21260	-1,26	1,4E-02	-1,50	1,3E-03	1		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter ATP-binding protein	Amino acid transport and metabolism	SI
70	2011mTn5STM.4.05.F07	cromosoma	SMc03015			-1,38	2,9E-03	1	<i>visN</i>	putative transcription regulator protein	transcription	NO
71	2011mTn5STM.2.09.A02	cromosoma	SMc02109	-1,37	4,6E-02	-1,39	3,5E-03	1	<i>clpA</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	SI
72	2011mTn5STM.1.08.H02	cromosoma	SMc03046	-1,27	1,5E-03	-1,38	8,6E-04	1	<i>rem</i>	putative transcription regulator protein	Signal transduction mechanisms	SI
73	2011mTn5STM.2.14.E09	NS		-1,46	1,9E-03	-1,18	2,1E-03					SI
74	2011mTn5STM.2.02.E02	cromosoma	SMc04005	-1,20	1,2E-02	-1,41	1,1E-02	1	<i>pykA</i>	pyruvate kinase	Carbohydrate transport and metabolism	Otra inserción
75	2011mTn5STM.4.13.E11	pSymB	Smb20529	-1,04	2,6E-02	-1,51	2,7E-03	1		hypothetical protein	Function unknown	SI
76	2011mTn5STM.4.13.D12	cromosoma	SMc02229	-1,09	4,5E-03	-1,32	4,5E-03	1		putative acyl-CoA dehydrogenase protein	Lipid transport and metabolism	SI
77	2011mTn5STM.2.02.A11	cromosoma	SMc03027	-1,18	2,6E-03	-1,23	3,7E-03	2	<i>flgB</i>	flagellar basal body rod protein FlgB	cell motility	SI
78	2011mTn5STM.2.08.B03	pSymB	Smb21262	-1,05	1,9E-02	-1,33	2,5E-04	3		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter permease protein	Amino acid transport and metabolism	SI
79	2011mTn5STM.5.10.E01	cromosoma	SMc04016	-1,10	1,2E-03	-1,23	2,7E-03	1	<i>hss</i>	homospermidine synthase protein	Secondary metabolites biosynthesis, function unknow	SI
80	2011mTn5STM.4.01.B05	cromosoma	SMc02407	-0,98	5,3E-03	-1,35	5,2E-03	1		hypothetical protein	function unknow	SI
81	2011mTn5STM.4.09.C08	cromosoma	SMc02562	-1,40	8,7E-03	-0,91	4,1E-03	2	<i>pckA</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	Energy production and conversion	SI
82	2011mTn5STM.5.13.F02	NS		-0,88	1,4E-02	-1,41	2,2E-02					SI
83	2011mTn5STM.2.01.A10	cromosoma	SMc02136			-1,14	9,6E-03	1		Hsp33-like chaperonin	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	NO
84	2011mTn5STM.3.08.G12	cromosoma	SMc03849	-1,16	2,4E-03	-1,08	9,7E-04	1	<i>ccmC</i>	putative HEME exporter C (cytochrome C-type biogenesis protein) transmembrane	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	SI
85	2011mTn5STM.4.07.G05	cromosoma	Smc03007	-1,09	3,1E-03	-1,14	3,0E-04	6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI
86	2011mTn5STM.4.04.B01	cromosoma	SMc03047	-1,13	1,2E-01*	-1,10	2,7E-03	1	<i>flgE</i>	flagellar hook protein FlgE	cell motility	SI
87	2011mTn5STM.2.02.B03	cromosoma	SMc00090	-1,07	2,1E-04	-1,12	6,0E-03	2	<i>cysN</i>	putative sulfate adenylate transferase cysteine biosynthesis protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
88	2011mTn5STM.4.03.B12	cromosoma	SMc03019	-0,90	2,4E-02	-1,27	3,9E-03	1	<i>fliG</i>	flagellar motor switch protein G	cell motility	NO
89	2011mTn5STM.4.03.G12	cromosoma	SMc00775	-1,36	8,3E-03	-0,80	3,9E-02	2	<i>fbpB</i>	putative IRON(III) permease protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
90	2011mTn5STM.3.07.H02	cromosoma	SMc02363	-1,05	5,3E-02*	-1,08	2,1E-03	2	<i>cycK</i>	cytochrome C-type biogenesis transmembrane protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Otra inserción

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserciones	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	7 d.p.i.
91	2011mTn5STM.2.04.A11	cromosoma	SMc00355	-1,38	6,9E-02*	-0,74	2,5E-03	1		hypothetical protein	Amino acid transport and metabolism	NO
92	2011mTn5STM.4.12.A10	cromosoma	SMc03048	-1,00	6,7E-03	-1,11	1,6E-04	2	<i>flgK</i>	flagellar hook-associated protein FlgK	cell motility	SI
93	2011mTn5STM.4.13.H08	cromosoma	SMc03007	-1,03	2,8E-02			6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI
94	2011mTn5STM.2.01.H08	cromosoma	SMc03021	-1,02	4,6E-03	-1,03	1,8E-03	2	<i>fliM</i>	flagellar motor switch transmembrane protein	cell motility	SI
95	2011mTn5STM.2.07.F11	cromosoma	SMc00012	-1,05	1,1E-03	-1,00	2,5E-03	1	<i>ctaG</i>	cytochrome C oxidase assembly protein	Posttranslational modification, protein	SI
96	2011mTn5STM.5.13.E03	NS		-0,95	1,9E-02	-1,09	1,7E-02					SI
97	2011mTn5STM.4.10.A07	cromosoma	SMc02123	-1,19	1,2E-04	-0,85	1,2E-03	2		hypothetical protein	function unknow	Otra inserción
98	2011mTn5STM.4.01.F10	cromosoma	SMc03021	-1,17	7,2E-03	-0,86	5,5E-02*	2	<i>fliM</i>	flagellar motor switch transmembrane protein	cell motility	SI
99	2011mTn5STM.2.09.H08	NS		-1,11	1,4E-02	-0,91	2,2E-03					SI
100	2011mTn5STM.5.14.C03	NS		-0,99	9,4E-04	-1,02	8,6E-03					SI
101	2011mTn5STM.4.12.C09	cromosoma	SMc00726	-0,90	6,2E-04	-1,08	1,2E-03	1	<i>tlpA</i>	putative thiol:disulfide interchange redox-active center transmembrane protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	SI
102	2011mTn5STM.4.12.A09	cromosoma	SMc02181	-0,98	2,9E-03	-0,98	2,3E-02	1	<i>putA</i>	bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	Amino acid transport and metabolism	SI
103	2011mTn5STM.3.05.C03	cromosoma	SMc02144			-0,98	3,4E-02	1	<i>pstC</i>	phosphate ABC transporter permease	Inorganic ion transport and metabolism	NO
104	2011mTn5STM.5.12.H04	cromosoma	SMc03933	-0,90	7,3E-03	-1,04	2,0E-03	1	<i>soxB2</i>	putative sarcosine oxidase subunit B protein	Amino acid transport and metabolism	Otra inserción
105	2011mTn5STM.4.07.H06	cromosoma	SMc00622	-1,04	4,9E-03	-0,86	3,9E-03	1	<i>rnd</i>	ribonuclease D protein	Translation	NO
106	2011mTn5STM.4.14.C11	NS		-0,97	8,4E-03	-0,92	6,4E-03					NO
107	2011mTn5STM.2.08.G07	pSymB	Smb21263	-0,88	1,5E-03	-1,01	2,5E-04	1		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter permease protein	Amino acid transport and metabolism	SI
108	2011mTn5STM.4.09.B01	cromosoma	SMc03980	-0,86	6,8E-03	-1,02	2,7E-05	1		hypothetical protein	fuction unknow	SI
109	2011mTn5STM.4.05.B12	NS		-0,94	1,1E-02	-0,93	4,3E-03					NO
110	2011mTn5STM.3.05.E04	cromosoma	SMc04127	-1,10	1,0E-03	-0,77	4,8E-02	1		ABC transporter ATP-binding protein	general prediction only	NO
111	2011mTn5STM.3.02.D02	cromosoma	SMc02363	-0,84	3,0E-02	-1,03	3,8E-02	2	<i>cycK</i>	cytochrome C-type biogenesis transmembrane protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	SI
112	2011mTn5STM.4.12.C04	pSymA	SMA1465	-0,78	2,0E-03	-1,08	5,3E-03	1		putative ABC transporter permease	Amino acid transport and metabolism	SI
113	2011mTn5STM.3.06.F10	cromosoma	SMc02562	-1,09	8,5E-03	-0,76	6,2E-03	2	<i>pckA</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	Energy production and conversion	SI
114	2011mTn5STM.1.08.E05	cromosoma	SMc04331	-0,88	3,1E-02	-0,96	1,5E-02	1	<i>mtbC</i>	putative dimethylamine corrinoid protein	general prediction only	SI
115	2011mTn5STM.3.15.G01	NS				-0,92	1,8E-02					NO
116	2011mTn5STM.4.04.B08	cromosoma	SMc03269	-0,77	1,0E-02	-1,07	2,8E-01*	1		putative peptide-binding periplasmic ABC transporter protein	Amino acid transport and metabolism	SI
117	2011mTn5STM.3.05.C11	pSymB	Smb20079	-0,92	8,7E-03			1		putative hemolysin-adenylate cyclase protein	Secondary metabolites biosynthesis,	SI
118	2011mTn5STM.1.06.C12	cromosoma	SMc03014	-0,92	7,2E-03	-0,90	4,1E-03	1	<i>fliF</i>	flagellar MS-ring protein	cell motility	NO
119	2011mTn5STM.2.04.E04	cromosoma	SMc00406	-0,79	4,2E-02	-1,02	8,8E-04	1		4Fe-4S ferredoxin iron-sulfur binding-domain containing protein	Energy production and conversion	SI
120	2011mTn5STM.4.09.H07	cromosoma	SMc01727	-0,90	2,7E-03			1		hypothetical protein	Carbohydrate transport and metabolism	NO

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserciones	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	7 d.p.i.
121	2011mTn5STM.1.10.B08	pSymB	Smb21261	-0,91	2,8E-03	-0,89	2,1E-02	1		putative mureinpeptide oligopeptide ABC transporter periplasmic solute-binding protein	Amino acid transport and metabolism	SI
122	2011mTn5STM.2.12.G07	cromosoma	SMc03023	-0,87	3,3E-03	-0,92	7,7E-03	1		hypothetical protein	Coenzyme transport and metabolism	SI
123	2011mTn5STM.1.05.A06	pSymB	Smb21463	-0,95	6,6E-02*	-0,80	1,4E-02	1		putative glycosyl hydrolase, 6-phospho-beta-glucosidase protein	Carbohydrate transport and metabolism	NO
124	2011mTn5STM.2.05.B08	pSymA	SMa1591			-0,86	2,7E-02	1	<i>cya3</i>	adenylate/guanylate cyclase	Signal transduction mechanisms	NO
125	2011mTn5STM.4.08.G02	pSymB	Smb21270	-0,88	8,1E-03	-0,84	1,5E-03	1		putative transcriptional regulator protein	Signal transduction mechanisms	NO
126	2011mTn5STM.4.12.H02	cromosoma	SMc02606	-0,87	1,1E-04	-0,83	4,3E-03	2	<i>soxA1</i>	putative sarcosine oxidase alpha subunit transmembrane protein	Amino acid transport and metabolism	SI
127	2011mTn5STM.1.08.D01	cromosoma	SMc03027	-0,85	5,8E-03	-0,85	1,9E-03	2	<i>flgB</i>	flagellar basal body rod protein FlgB	cell motility	SI
128	2011mTn5STM.4.03.B06	cromosoma	SMc00781	-0,92	9,9E-03	-0,77	2,4E-01*	1	<i>iolA</i>	putative malonic semialdehyde oxidative decarboxylase protein	Energy production and conversion	SI
129	2011mTn5STM.3.07.G10	NS		-0,79	5,0E-03	-0,88	2,2E-03					SI
130	2011mTn5STM.4.13.D04	pSymB	Smb20723	-0,89	1,9E-02	-0,78	3,8E-02	1		putative iron ABC transporter periplasmic solute-binding protein precursor	Inorganic ion transport and metabolism	SI
131	2011mTn5STM.4.05.C04	NS		-0,78	4,8E-04	-0,87	7,1E-03					NO
132	2011mTn5STM.3.07.E01	pSymB	Smb20624	-0,88	1,5E-02	-0,76	1,3E-03	1	<i>mtnA</i>	methylthioribose-1-phosphate isomerase	Translation	NO
133	2011mTn5STM.5.05.G03	cromosoma	SMc02274	-0,78	1,4E-01*	-0,86	8,2E-02*	1	<i>rkpU</i>	capsule polysaccharide exporter protein	Not in cogs	SI
134	2011mTn5STM.4.04.C02	cromosoma	SMc03931	-0,82	5,8E-02*	-0,81	2,7E-03	1	<i>soxA2</i>	putative sarcosine oxidase alpha subunit	Amino acid transport and metabolism	NO
135	2011mTn5STM.3.05.E01	cromosoma	SMc03948	-0,82	3,5E-02	-0,80	3,0E-02	1	<i>TRm1b</i>	transposase ISRM1	Replication, recombination and repair	NO
136	2011mTn5STM.2.05.D11	pSymB	Smb20615	-0,82	2,0E-03	-0,78	8,2E-02*	1	<i>thiC</i>	thiamine biosynthesis protein ThiC	Coenzyme transport and metabolism	NO
137	2011mTn5STM.2.12.C12	cromosoma	SMc03070	-0,81	2,6E-02	-0,79	8,7E-03	1	<i>zwf</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Carbohydrate transport and metabolism	SI
138	2011mTn5STM.5.10.G01	cromosoma	SMc00294	-0,78	1,8E-02	-0,82	2,2E-02	1		aminotransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
139	2011mTn5STM.3.13.G06	pSymB	Smb20652	-0,77	6,1E-02*	-0,81	2,3E-02	1	<i>asnB</i>	putative asparagine synthetase protein	Amino acid transport and metabolism	SI
140	2011mTn5STM.4.13.C12	cromosoma	SMc01164	-0,87	2,0E-03	-0,71	1,0E-02	1		hypothetical protein	Transcription	SI
141	2011mTn5STM.2.03.C08	cromosoma	SMc04095	-0,71	1,4E-02	-0,87	2,1E-02	1		putative acyl-CoA synthetase protein	Lipid transport and metabolism	NO
142	2011mTn5STM.3.14.H02	NS		-0,71	5,4E-03	-0,84	2,2E-03					NO
143	2011mTn5STM.2.13.E01	cromosoma	SMc01143	-0,83	6,3E-03	-0,70	5,3E-02*	1		heat-inducible transcription repressor	Transcription	NO
144	2011mTn5STM.4.09.B10	cromosoma	SMc04333	-0,80	3,8E-02	-0,72	7,2E-03	1		hypothetical protein	Not in cogs	SI
145	2011mTn5STM.4.07.B08	cromosoma	SMc03220	-0,77	6,3E-02*	-0,73	1,9E-02	1	<i>rna23s</i>	ribosomal RNA-23S	RNA	SI
146	2011mTn5STM.1.05.A11	cromosoma	SMc03761	-0,78	1,7E-02	-0,71	4,9E-02	1		hypothetical protein	general prediction only	NO
147	2011mTn5STM.1.02.C04	cromosoma	SMc01507	-0,77	8,9E-03	-0,72	3,8E-03	1		hypothetical protein	Signal transduction mechanisms	NO
148	2011mTn5STM.1.08.D04	cromosoma	SMc03048	-0,76	1,5E-01*	-0,72	1,5E-01*	2	<i>flgK</i>	flagellar hook-associated protein FlgK	cell motility	SI
149	2011mTn5STM.3.01.C02	cromosoma	SMc04093			-0,72	1,6E-03	1	<i>acsA1</i>	acetyl-CoA synthetase	Lipid transport and metabolism	SI
150	2011mTn5STM.5.10.C04	cromosoma	SMc02606	-0,70	1,3E-02	-0,73	8,8E-03	2	<i>soxA1</i>	putative sarcosine oxidase alpha subunit	Amino acid transport and metabolism	Otra inserción
151	2011mTn5STM.3.14.F01	NS				-0,70	1,0E-03					NO

Al. Tabla 2. Lista de mutantes de *S. meliloti* afectados positivamente en la colonización de rizósferas de plantas de alfalfa a los 3 d.p.i.

Los mutantes se encuentran ordenados por orden decreciente de valor M promedio (promedio no mostrado). Los mutantes que sólo muestran valores asociados a la firma K o H sólo pudieron ser analizados por esa firma. NS: Mutante cuyo sitio de inserción no ha sido secuenciado. * Valor $p > 0,05$. La columna inserciones cuenta el número de veces que ese gen se encuentra repetido en la misma lista. La columna "7 d.p.i." indica el comportamiento de ese mutante en los experimentos de colonización de plantas de alfalfa 7 d.p.i. "SI" indica que ese mismo mutante se encontró afectado a los 7 d.p.i. "NO" indica que ese mutante no se encontró afectado a los 7 d.p.i.. "otra inserción" indica que ese mutante no fue encontrado afectado a los 7 d.p.i. pero si se encontró otro mutante afectado en el mismo gen. El producto génico y la categoría funcional fueron extraídos de la base de datos Rhizobase (Sección Materiales y métodos II.6). UR: unidad repetitiva

Afectados positivamente alfalfa 3 d.p.i

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test -H	Inserciones	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	7 d.p.i.
1	2011mTn5STM.3.09.E11	cromosoma	SMc04208	1,00	3,37E-03	1,94	1,53E-01*	1		putative toxin secretion transmembrane protein	Cell wall/membrane biogenesis	NO
2	2011mTn5STM.1.05.B11	pSymB	Smb21535	1,47	1,34E-03	1,22	2,19E-03	1		putative transcriptional regulator, lysR family	Transcription	SI
3	2011mTn5STM.3.12.E12	pSymA	SMa_TSS084	1,15	9,90E-05	1,52	2,17E-02	1		SMa_TSS0842		SI
4	2011mTn5STM.2.14.A03	NS		1,25	3,12E-04	1,33	2,82E-03	1				SI
5	2011mTn5STM.2.04.B05	cromosoma	SMc00499	1,25	2,96E-03	1,31	2,79E-03	1		hypothetical protein	function unknow	NO
6	2011mTn5STM.4.14.D05	NS		1,08	2,17E-04	1,48	9,41E-04	1				SI
7	2011mTn5STM.1.05.D10	pSymB	SMB20981			1,28	8,18E-04	1		putative C4-dicarboxylate transporter periplasmic solute-binding protein precursor	Carbohydrate transport and metabolism	SI
8	2011mTn5STM.1.09.D03	cromosoma	SMc02352	1,13	3,83E-04	1,39	3,28E-03	1		putative glutamine synthetase protein	Not in COGs	SI
9	2011mTn5STM.2.02.C02	cromosoma	SMc01412	1,50	1,32E-03	1,01	7,14E-04	2		hypothetical protein	function unknow	SI
10	2011mTn5STM.2.14.H10	NS		1,10	3,13E-03	1,39	5,50E-03	1				NO
11	2011mTn5STM.1.06.H06	cromosoma	SMc02273	1,06	1,34E-03	1,35	2,80E-03	1	<i>rkpA</i>	fatty acid synthase transmembrane protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	SI
12	2011mTn5STM.1.09.G11	cromosoma	SMc01811			1,17	1,66E-02	1	<i>TRm20C</i>	putative partial transposase protein	Not in COGs	NO
13	2011mTn5STM.1.05.B07	cromosoma	SMc02376	1,18	2,42E-03	1,16	1,52E-02	1		putative heat shock protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	SI
14	2011mTn5STM.1.04.E09	pSymB	Intergenico	1,11	2,22E-02	1,19	4,09E-03	1			Intergénico	SI
15	2011mTn5STM.1.05.F05	pSymB	SMB20363			1,14	3,66E-04	1		putative iron ABC transporter ATP-binding protein	Amino acid transport and metabolism	SI
16	2011mTn5STM.3.14.C05	NS		1,05	2,76E-03	1,23	2,56E-04	1				NO
17	2011mTn5STM.1.08.G01	cromosoma	SMc00159	1,06	2,00E-03	1,21	4,82E-04	1		putative signal peptide protein	Intracellular trafficking and secretion	SI
18	2011mTn5STM.1.10.H09	cromosoma	SMc00973	1,11	5,98E-03	1,16	5,84E-03	1		hypothetical protein	Not in COGs	NO
19	2011mTn5STM.2.04.B10	pSymA	SMA0564	1,18	1,29E-02	1,08	9,93E-04	1		dehydrogenase	Not in COGs	SI
20	2011mTn5STM.3.14.B09	NS		1,17	2,37E-03	1,06	6,71E-04	1				NO
21	2011mTn5STM.3.14.C08	NS		1,03	4,35E-03	1,16	5,55E-03	1				SI
22	2011mTn5STM.4.14.B06	NS		1,12	4,10E-04	1,07	1,30E-04	1				SI
23	2011mTn5STM.4.02.C12	pSymB	Smb20775	1,02	1,92E-03	1,16	1,17E-03	1		TonB-dependent receptor protein	General prediction only	SI
24	2011mTn5STM.1.03.F07	cromosoma	SMc04222	0,96	8,83E-02*	1,20	9,96E-03	1		hypothetical protein	function unknow	SI
25	2011mTn5STM.1.08.G03	pSymB	Smb20519	0,98	1,48E-03	1,18	2,13E-03	1		hypothetical protein	not in cogs	NO
26	2011mTn5STM.2.04.F04	cromosoma	SMc00783	1,16	9,66E-02*	0,95	4,30E-03	1		hypothetical protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	SI
27	2011mTn5STM.1.01.C03	pSymB	Smb20562	1,00	1,28E-03	1,11	4,47E-03	1		hypothetical protein	Cell wall/membrane biogenesis	NO
28	2011mTn5STM.1.12.C07	pSymA	SMA0803	1,00	7,31E-04	1,11	1,35E-03	1		ABC transporter, ATP-binding protein	Amino acid transport and metabolism	SI
29	2011mTn5STM.2.02.C04	pSymA	SMA1301	1,08	2,40E-03	1,01	4,22E-03	1		Permease	not in cogs	SI
30	2011mTn5STM.4.14.C08	NS		0,89	8,35E-03	1,20	1,73E-03	1				SI
31	2011mTn5STM.1.02.C03	NS		1,00	1,13E-03	1,07	4,04E-04	1				SI
32	2011mTn5STM.1.06.F06	pSymB	Smb21281	0,94	1,15E-03	1,10	7,06E-03	1		xanthineuracil permease family protein	General prediction only	SI
33	2011mTn5STM.1.14.E05	cromosoma	SMc00373	0,97	8,81E-03	1,06	4,98E-03	1		hypothetical protein	Not in COGs	SI

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserciones	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	7 d.p.i.
34	2011mTn5STM.1.02.E04	pSymB	Smb21189	0,90	1,53E-03	1,09	5,55E-03	1		putative glycosyltransferase protein	Cell wall/membrane biogenesis	SI
35	2011mTn5STM.1.05.A05	pSymB	Smb20969	1,03	7,81E-03	0,97	7,49E-03	1		putative sugar uptake ABC transporter permease protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
36	2011mTn5STM.1.05.F07	pSymA	SMa2365	1,05	1,79E-02	0,94	6,31E-03	1		ABC transporter ATP-binding protein	General function prediction only	NO
37	2011mTn5STM.1.03.E03	NS		0,73	1,03E-02	1,25	1,54E-03	1				SI
38	2011mTn5STM.1.05.D04	cromosoma	UR	0,86	2,54E-02	1,11	3,37E-03	1		AL581688		SI
39	2011mTn5STM.1.03.D07	pSymA	SMa0464	1,00	5,86E-03	0,96	2,89E-04	1		adenylate/guanylate cyclase	Signal transduction mechanisms	NO
40	2011mTn5STM.5.14.F03	NS		0,98	2,68E-03			1				NO
41	2011mTn5STM.1.10.F06	cromosoma	UR	1,01	6,34E-03	0,95	3,75E-02	1		AL581688		NO
42	2011mTn5STM.2.14.E07	NS		1,04	1,06E-02	0,90	2,37E-04	1				SI
43	2011mTn5STM.3.01.E10	pSymB	Smb21584	1,04	9,31E-04	0,90	1,17E-02	1		hypothetical protein	not in cogs	SI
44	2011mTn5STM.3.02.F08	pSymA	SMa1236	0,93	6,05E-04	1,01	9,78E-04	1	<i>napA</i>	nitrate reductase	Energy production and conversion	SI
45	2011mTn5STM.1.05.G05	pSymB	Smb20024	0,99	1,36E-02	0,94	2,86E-02	1		ribosomal large subunit pseudouridine synthase B	translation	NO
46	2011mTn5STM.2.01.G09	pSymB	Smb21291	0,98	1,69E-02	0,94	1,34E-02	1		putative transcriptional regulator, lysR family protein	Transcription	SI
47	2011mTn5STM.1.03.F06	cromosoma	SMc01977	0,96	1,31E-02	0,96	6,21E-02*	1		putative sugar-binding periplasmic ABC transporter protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
48	2011mTn5STM.1.03.B10	pSymB	Smb21255	0,88	4,15E-03	1,02	1,75E-02	1		hypothetical protein	not in cogs	NO
49	2011mTn5STM.1.12.G07	cromosoma	SMc01821	0,88	9,98E-04	1,02	1,45E-04	1	<i>dht</i>	dihydropyrimidinase	Nucleotide transport and metabolism	SI
50	2011mTn5STM.1.06.B07	pSymB	Smb21087	1,16	1,37E-03	0,73	2,88E-03	1	<i>traA2</i>	putative conjugal transfer protein	Replication, recombination and repair	SI
51	2011mTn5STM.3.12.C11	pSymB	SMb20941	0,94	2,19E-04			1	<i>exsA</i>	MsbA-like saccharide exporting ABC transporter ATP-binding/permease subunits	Defense mechanisms	SI
52	2011mTn5STM.2.10.E09	cromosoma	SMc00106	0,88	2,36E-03	1,00	2,55E-03	1		hypothetical protein	Amino acid transport and metabolism	NO
53	2011mTn5STM.3.08.C07	cromosoma	Intergenico	0,96	3,47E-04	0,92	1,09E-02	1		Intergénico		SI
54	2011mTn5STM.2.02.D02	cromosoma	SMc_asRNA	0,92	4,04E-03	0,95	4,38E-03	1		SMc_asRNA_1713		SI
55	2011mTn5STM.4.12.E08	pSymB	Smb20486	0,89	3,96E-04	0,98	1,75E-03	1		putative sugar ABC transporter permease protein	Carbohydrate transport and metabolism	NO
56	2011mTn5STM.1.08.G07	cromosoma	SMc_sRNA_	0,89	4,33E-04	0,98	6,62E-03	1		SMc_sRNA_241		SI
57	2011mTn5STM.4.12.F06	cromosoma	SMc01466	0,99	2,43E-04	0,87	1,80E-03	1		transposase	Replication, recombination and repair	NO
58	2011mTn5STM.4.08.E03	cromosoma	SMc00096	0,96	6,11E-03	0,90	1,93E-03	1		hypothetical protein	Energy production and conversion	NO
59	2011mTn5STM.1.14.F07	pSymA	SMa0892	0,88	1,01E-03	0,96	8,18E-05	1	<i>dnaE3</i>	DnaE3 DNA polymerase III alpha chain	Replication, recombination and repair	SI
60	2011mTn5STM.1.12.F06	pSymB	Smb20390	0,86	4,07E-03	0,98	8,24E-04	1		hypothetical protein	Cell wall/membrane biogenesis	SI
61	2011mTn5STM.3.14.F03	NS		0,94	4,64E-05	0,89	1,86E-04	1				NO
62	2011mTn5STM.1.09.G08	pSymB	Smb20385	0,85	2,53E-03	0,95	4,01E-03	1		hypothetical protein	not in cogs	SI
63	2011mTn5STM.3.05.D03	cromosoma	SMc01051	1,03	2,39E-02	0,76	7,65E-03	1	<i>mazG</i>	nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase	General function prediction only	SI
64	2011mTn5STM.1.02.D07	cromosoma	SMc01373	0,90	1,24E-04	0,89	1,94E-03	1	<i>dinP</i>	DNA polymerase IV	Replication, recombination and repair	SI
65	2011mTn5STM.1.09.C07	pSymB	Smb20333	0,74	1,42E-02	1,05	4,80E-03	1		transporter protein	not in cogs	NO

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserciones	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	7 d.p.i.
66	2011mTn5STM.2.14.H01	NS		0,83	5,03E-05	0,95	2,91E-04	1				NO
67	2011mTn5STM.1.07.C05	cromosoma	SMc01212	0,81	2,27E-03	0,96	8,11E-04	1		putative transport transmembrane protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
68	2011mTn5STM.3.05.G03	cromosoma	SMc01829	0,92	1,18E-02	0,85	1,90E-03	1		putative transport transmembrane protein	defense mechanism	NO
69	2011mTn5STM.3.14.B07	NS		0,93	1,52E-03	0,83	1,12E-02	1				NO
70	2011mTn5STM.1.03.D03	pSymB	Smb20349	0,82	2,22E-03	0,92	6,60E-04	1		sugar ABC transporter	Carbohydrate transport and metabolism	SI
71	2011mTn5STM.1.04.F05	cromosoma	SMc04128			0,87	1,70E-02	2		putative heavy metal transporting ATPase	Inorganic ion transport and metabolism	SI
72	2011mTn5STM.3.12.D07	cromosoma		0,82	4,85E-03	0,91	2,86E-05			Intergénico		NO
73	2011mTn5STM.1.03.F03	pSymA	SMa0130	0,71	1,33E-02	1,02	6,12E*02	1		Fatty acid desaturase	Lipid transport and metabolism	NO
74	2011mTn5STM.1.07.D07	pSymB	Smb21495	0,80	4,21E-04	0,92	2,12E-03	1		putative protease protein	not in cogs	SI
75	2011mTn5STM.1.12.G05	pSymA	SMa0621	0,85	2,48E-03	0,87	1,40E-04	1	<i>fixI2</i>	FixI2 E1-E2 type cation ATPase	Inorganic ion transport and metabolism	NO
76	2011mTn5STM.1.05.E12	cromosoma	SMc01663	1,00	1,55E-02	0,71	1,04E-02	1		putative oxidoreductase protein	Amino acid transport and metabolism	SI
77	2011mTn5STM.1.08.B10	pSymB	Smb21578	0,75	2,14E-03	0,95	1,57E-02	1	<i>atcU2</i>	putative copper-transporting P-type ATPase protein	Inorganic ion transport and metabolism	NO
78	2011mTn5STM.2.02.E05	cromosoma	SMc01412	0,96	2,25E-03	0,74	4,40E-03	2		hypothetical protein	function unknow	SI
79	2011mTn5STM.1.08.F08	pSymB	Smb20697	0,83	1,46E-03	0,86	7,31E-04	1		putative peptidase, arginine utilization protein	Amino acid transport and metabolism	SI
80	2011mTn5STM.3.09.C09	pSymB	Smb21230	0,91	2,03E-03	0,77	1,09E-03	1		putative glycosyltransferase protein	Cell wall/membrane biogenesis	NO
81	2011mTn5STM.2.07.C06	pSymB		0,73	1,54E-03	0,95	7,29E-04	1		Intergénico		SI
82	2011mTn5STM.3.12.C05	pSymA		0,80	4,55E-03	0,86	4,35E-03	1		Intergénico		NO
83	2011mTn5STM.1.05.G07	pSymA	SMa1597	0,83	2,68E-02	0,83	2,64E-02	1		Pilus assembly chaperone	cell motility	SI
84	2011mTn5STM.1.03.D04	pSymA	SMa1531	0,83	1,03E-03	0,81	5,11E-02*	1	<i>nuoC2</i>	NuoC2 NADH I chain C	Energy production and conversion	SI
85	2011mTn5STM.3.14.F04	NS		0,75	3,01E-03	0,89	9,88E-03	1				SI
86	2011mTn5STM.2.14.D09	NS		0,75	1,53E-03	0,89	7,31E-03	1				NO
87	2011mTn5STM.1.09.G05	cromosoma	SMc04128	0,82	4,23E-04	0,82	9,57E-04	2		putative heavy metal transporting ATPase protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
88	2011mTn5STM.1.02.E09	cromosoma	SMc02021	0,77	4,55E-03	0,85	3,29E-03	1		putative periplasmic binding ABC transporter protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
89	2011mTn5STM.3.09.B09	pSymA	SMa0683	0,90	4,83E-03	0,72	6,23E-03	1		Cation efflux protein	not in cogs	NO
90	2011mTn5STM.1.10.C07	cromosoma	SMc03156	0,74	2,72E-03	0,87	1,32E-02	1		Hypothetical protein	General function prediction only	NO
91	2011mTn5STM.3.14.D08	NS		0,80	6,67E-03			1				NO
92	2011mTn5STM.1.14.E06	pSymA		0,86	3,20E-03	0,74	5,21E-03	1		Intergénico		SI
93	2011mTn5STM.2.07.B10	pSymA	SMa1662	0,83	1,03E-03	0,75	1,84E-03	1		Cation/multidrug efflux pump	defense mechanism	SI
94	2011mTn5STM.1.03.E09	cromosoma	SMc02618	0,71	1,29E-02	0,87	3,63E-03	1		hypothetical protein	Not in COGs	NO
95	2011mTn5STM.4.14.F08	NS		0,79	8,23E-04	0,79	3,68E-05	1				SI
96	2011mTn5STM.4.01.E08	pSymB	Smb20925	0,75	4,64E-02	0,81	5,05E-03	1		hypothetical protein	General prediction only	NO
97	2011mTn5STM.2.09.C09	pSymB	Smb20959			0,77	1,49E-04	1	<i>exoO</i>	glucosyltransferase protein	Cell wall/membrane biogenesis	NO
98	2011mTn5STM.3.01.G03	cromosoma	SMc00770	0,72	5,11E-03	0,81	5,85E-04	1	<i>potF</i>	putrescine-binding periplasmic protein	Amino acid transport and metabolism	SI
99	2011mTn5STM.1.08.C10	pSymB		0,78	4,30E-07	0,71	3,03E-04	1		Intergénico		NO

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserciones	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	7 d.p.i.
100	2011mTn5STM.3.12.A05	cromosoma	SMc00721			0,75	2,55E-02	1		transposase	Replication, recombination and repair	SI
101	2011mTn5STM.1.07.B10	cromosoma	SMc00241	0,77	2,62E-03	0,72	1,67E-02	1		putative transcription regulator protein	transcription	NO
102	2011mTn5STM.4.04.E04	pSymA	SMa1146			0,74	9,05E-03	1		hypothetical protein	energy production and conversion	NO
103	2011mTn5STM.1.05.H05	pSymA	SMa0680	0,74	2,60E-02			1		amino acid (ornithine, lysine, arginine)	Amino acid transport and metabolism	NO
104	2011mTn5STM.1.09.H07	cromosoma	SMc03061			0,74	6,30E-04	1	<i>aglE</i>	alpha-glucoside ABC transporter periplasmic-binding protein	Carbohydrate transport and metabolism	NO
105	2011mTn5STM.2.09.E10	NS		0,74	1,34E-02	0,73	5,07E-02*	1				NO
106	2011mTn5STM.1.14.C01	cromosoma	SMc03162	0,71	5,60E-04	0,71	2,09E-03	1		Hypotheticalprotein	Carbohydrate transport and metabolism	NO
107	2011mTn5STM.3.04.C03	NS				0,71	9,70E-03	1				SI

Anexo II

All. Tabla 1. Lista de mutantes de *S. meliloti* afectados negativamente en la colonización de rizósferas de plantas de alfalfa 7 d.p.i.

Los mutantes se encuentran ordenados por orden creciente de valor M promedio (promedio no mostrado). Los mutantes que sólo muestran valores asociados a la fima K o H sólo pudieron ser analizados por esa firma. NS: Mutante cuyo sitio de inserción no ha sido secuenciado. * indica valor $p > 0,05$. La columna inserciones cuenta el número de veces que ese gen se encuentra repetido en la misma lista. La columna "3 d.p.i." indica el comportamiento de ese mutante en los experimentos de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i. "SI" indica que ese mismo mutante se encontró afectado a los 7 d.p.i. "No encontrado" indica que ese mutante no se encontró afectado a los 7 d.p.i.. "otra inserción" indica que ese mutante no fue encontrado afectado a los 7 d.p.i. pero si se encontró otro mutante afectado en el mismo gen. "No analizado" indica que ese mutante no fue analizado a los 3 d.p.i. El producto génico y la categoría funcional fueron extraídos de la base de datos Rhizobase (Sección Materiales y métodos II.6). UR: Unidad repetitiva.

Afectados negativamente 7dpi

N°	Mutante	Replicon	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test -H	Inserc.	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	3dpi
1	2011mTn5STM.3.05.A06	cromosoma	SMc04346			-6,02	5,43E-04	4	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	Amino acid transport and metabolism	SI
2	2011mTn5STM.3.08.B05	cromosoma	SMc00641	-5,43	5,05E-05	-6,33	1,09E-03	2	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Coenzyme transport and metabolism	SI
3	2011mTn5STM.1.05.A08	cromosoma	SMc04028	-6,21	3,72E-05	-5,50	1,92E-04	1		glutamate synthase NADPH large chain protein	Amino acid transport and metabolism	SI
4	2011mTn5STM.3.06.A07	NS		-5,80	1,48E-04	-5,86	1,14E-03					SI
5	2011mTn5STM.1.08.C11	cromosoma	SMc04346	-6,07	3,31E-04	-5,03	7,29E-04	4	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	amino acid transport and metabolism	SI
6	2011mTn5STM.2.05.D01	cromosoma	SMc04026	-6,04	3,84E-06	-5,01	4,80E-04	1	<i>gltD</i>	glutamate synthase subunit beta	Amino acid transport and metabolism	SI
7	2011mTn5STM.3.10.F05	cromosoma	SMc01431	-6,01	2,96E-04	-4,87	7,75E-04	3	<i>ilvI</i>	acetolactate synthase 3 catalytic subunit	Amino acid transport and metabolism	SI
8	2011mTn5STM.1.03.D11	cromosoma	SMc04346	-5,48	3,17E-04	-5,17	3,67E-03	4	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	Amino acid transport and metabolism	SI
9	2011mTn5STM.4.06.H03	cromosoma	SMc01431	-5,12	7,67E-05			3	<i>ilvI</i>	acetolactate synthase 3 catalytic subunit	Amino acid transport and metabolism	SI
10	2011mTn5STM.3.07.B02	cromosoma	SMc00963	-5,34	9,34E-05	-4,76	1,48E-03	2		hypothetical protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
11	2011mTn5STM.2.11.D01	cromosoma	SMc01431	-5,70	1,22E-04	-4,39	2,35E-03	3	<i>ilvI</i>	acetolactate synthase 3 catalytic subunit	Amino acid transport and metabolism	No analizado
12	2011mTn5STM.5.05.D01	cromosoma	SMc02717	-4,90	4,21E-05	-5,09	4,57E-04	1	<i>leuA1</i>	2-isopropylmalate synthase	not in cogs	SI
13	2011mTn5STM.2.14.D07	NS		-5,25	6,08E-04	-4,66	6,83E-03					SI
14	2011mTn5STM.5.07.H04	pSymB	Smb21555	-4,86	1,89E-04	-5,03	2,08E-03	1	<i>kefB2</i>	protein_coding_gene	Inorganic ion transport and metabolism	SI
15	2011mTn5STM.1.09.H12	cromosoma	SMc02767	-5,07	6,65E-06	-4,31	2,21E-03	1	<i>trpF</i>	N-(5'-phosphoribosyl)anthranilate isomerase	Amino acid transport and metabolism	SI
16	2011mTn5STM.2.10.D03	cromosoma	SMc00641	-4,49	1,18E-04	-4,69	9,19E-03	2	<i>serA</i>	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	Coenzyme transport and metabolism	SI
17	2011mTn5STM.2.01.D04	cromosoma	SMc02165	-3,53	1,09E-04	-5,59	7,41E-03	1	<i>pyrE</i>	orotate phosphoribosyltransferase	Nucleotide transport and metabolism	SI
18	2011mTn5STM.2.07.E03	cromosoma	SMc00963	-4,72	7,24E-04	-4,28	3,00E-03	2		hypothetical protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
19	2011mTn5STM.5.02.F01	cromosoma	SMc00235	-5,61	2,62E-03	-3,38	6,34E-03	1	<i>trpD</i>	anthranilate phosphoribosyltransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
20	2011mTn5STM.3.05.A05	cromosoma	SMc04045			-4,42	1,31E-02	1	<i>ilvD2</i>	dihydroxy-acid dehydratase	Amino acid transport and metabolism	SI
21	2011mTn5STM.4.06.D02	cromosoma	SMc04346	-4,75	1,03E-03	-3,94	3,60E-03	4	<i>ilvC</i>	ketol-acid reductoisomerase	Amino acid transport and metabolism	SI
22	2011mTn5STM.4.06.D06	NS		-4,29	3,62E-05	-4,26	1,74E-03					SI
23	2011mTn5STM.4.12.C12	cromosoma	SMc04042	-5,12	4,06E-04	-3,33	1,95E-03	1		putative monophosphatase protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
24	2011mTn5STM.2.02.E07	cromosoma	SMc04405	-4,12	1,34E-03	-4,31	9,05E-04	1	<i>leuB</i>	3-isopropylmalate dehydrogenase	Energy production and conversion	SI
25	2011mTn5STM.1.07.F11	cromosoma	SMc00488	-3,84	1,01E-03	-4,38	1,08E-02	1	<i>purL</i>	phosphoribosylformylglycinamide synthase II	Nucleotide transport and metabolism	SI
26	2011mTn5STM.3.03.G02	cromosoma	SmelC094	-3,63	4,55E-05	-4,08	1,87E-03	1		probablemente afectando pyrC y E		SI
27	2011mTn5STM.2.11.A09	cromosoma	SMc02899	-3,79	1,52E-04	-3,75	6,95E-05	2	<i>pheA</i>	prephenate dehydratase	Amino acid transport and metabolism	No analizado
28	2011mTn5STM.2.06.A08	cromosoma	SMc03797	-3,60	1,19E-05	-3,78	4,45E-05	4	<i>metA</i>	homoserine O-succinyltransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
29	2011mTn5STM.1.05.A04	cromosoma	SMc04348	-3,69	9,47E-05	-3,45	3,53E-03	1		putative transcription regulator protein	transcription	SI
30	2011mTn5STM.2.04.A06	cromosoma	SMc00554	-4,05	1,01E-03	-3,07	5,64E-04	1	<i>purF</i>	amidophosphoribosyltransferase	Nucleotide transport and metabolism	SI
31	2011mTn5STM.1.02.C06	cromosoma	SMc02791	-3,57	3,71E-04	-3,54	4,03E-03	1	<i>aroE1</i>	shikimate 5-dehydrogenase	Amino acid transport and metabolism	SI
32	2011mTn5STM.4.09.F03	cromosoma	SMc03797	-3,52	1,70E-04	-3,40	4,20E-05	4	<i>metA</i>	homoserine O-succinyltransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
33	2011mTn5STM.2.11.H10	cromosoma	SMc03797	-4,14	4,93E-04	-2,77	5,61E-03	4	<i>metA</i>	homoserine O-succinyltransferase	Amino acid transport and metabolism	No analizado
34	2011mTn5STM.3.13.H06	cromosoma	SMc02899	-3,45	1,44E-04	-3,37	5,13E-03	2	<i>pheA</i>	prephenate dehydratase	Amino acid transport and metabolism	SI
35	2011mTn5STM.4.07.C10	cromosoma	SMc01578	-3,19	2,96E-03	-3,60	2,04E-02	1	<i>aatA</i>	aspartate aminotransferase	Amino acid transport and metabolism	SI

N°	Mutante	Replicon	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserc.	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	3dpi
36	2011mTn5STM.2.04.E06	cromosoma	SMc02123	-2,85	4,82E-03	-3,69	1,63E-02	1		hypothetical protein	function unknow	SI
37	2011mTn5STM.4.10.B06	NS		-2,95	2,41E-04	-3,53	1,76E-03					SI
38	2011mTn5STM.4.02.D11	cromosoma	SMc01139	-3,52	1,61E-03	-2,94	6,41E-03	1	<i>rpoN</i>	RNA polymerase factor sigma-54	Transcription	SI
39	2011mTn5STM.3.01.B12	cromosoma	SMc03797	-3,39	1,37E-05	-3,01	1,06E-03	4	<i>metA</i>	homoserine O-succinyltransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
40	2011mTn5STM.1.11.C04	cromosoma	SMc02450	-3,36	2,30E-03	-2,83	3,96E-03	1	<i>argJ</i>	bifunctional ornithine acetyltransferase/N-acetylglutamate synthase protein	Not in cogs	No analizado
41	2011mTn5STM.1.01.E09	cromosoma	SmelC100	-3,25	1,68E-04	-2,53	3,68E-03	1		probablemente afectando transcripción metZ		SI
42	2011mTn5STM.2.11.H09	cromosoma	SMc03979	-2,63	1,01E-04	-2,83	4,94E-03	1		glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Carbohydrate transport and metabolism	No analizado
43	2011mTn5STM.2.06.A11	cromosoma	SMc01042	-2,35	1,38E-03	-3,09	1,71E-03	1	<i>ntrB</i>	nitrogen regulation protein	Signal transduction mechanisms	SI
44	2011mTn5STM.4.11.E08	cromosoma	SMc04005	-2,78	2,68E-03	-2,51	3,64E-03	1	<i>pykA</i>	pyruvate kinase	Carbohydrate transport and metabolism	No analizado
45	2011mTn5STM.4.10.D03	cromosoma	Smc03007	-2,45	7,89E-04	-2,72	1,81E-03	6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI
46	2011mTn5STM.1.11.F12	NS		-2,80	4,84E-05	-2,29	9,02E-03					No analizado
47	2011mTn5STM.3.10.F09	cromosoma	Smc03005	-2,41	1,25E-03	-2,65	1,38E-02	1		hypothetical protein	Not in cogs	SI
48	2011mTn5STM.4.10.G11	cromosoma	SMc03004	-2,59	7,98E-04	-2,37	1,66E-02	4	<i>mcpE</i>	putative chemoreceptor (methyl-accepting chemotaxis protein)	cell motility	SI
49	2011mTn5STM.4.04.C12	cromosoma	SMc01053	-2,44	9,01E-03	-2,48	9,51E-05	1	<i>cysG</i>	siroheme synthase protein	Coenzyme transport and metabolism	SI
50	2011mTn5STM.4.09.A09	cromosoma	SMc02435	-2,60	3,00E-04	-2,16	2,60E-02	1	<i>hemK1</i>	putative methyltransferase protein	Translation	SI
51	2011mTn5STM.4.07.A01	pSymB	Smb21262	-2,57	1,23E-03	-2,01	2,11E-02	3		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter permease protein	Amino acid transport and metabolism	SI
52	2011mTn5STM.4.13.E02	cromosoma	SMc00775	-2,22	7,31E-04	-2,19	1,28E-03	2	<i>fbpB</i>	putative IRON(III) permease protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
53	2011mTn5STM.4.02.E06	cromosoma	SMc02226	-2,50	1,03E-03	-1,76	8,00E-03	1		hypothetical protein	function unknow	SI
54	2011mTn5STM.3.01.H10	cromosoma	SMc00091	-2,11	2,07E-03			1		sulfate adenyltransferase subunit 2	Amino acid transport and metabolism	SI
55	2011mTn5STM.4.09.C08	cromosoma	SMc02562	-1,89	7,95E-04	-2,17	5,22E-04	2	<i>pckA</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	Energy production and conversion	SI
56	2011mTn5STM.5.10.E01	cromosoma	SMc04016	-2,15	3,94E-03	-1,91	1,24E-02	1	<i>hss</i>	homospermidine synthase protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	SI
57	2011mTn5STM.5.06.E01	pSymB	Smb21262	-1,97	3,61E-04	-1,72	1,53E-02	3		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter permease protein	Amino acid transport and metabolism	SI
58	2011mTn5STM.1.05.E03	NS		-1,88	2,53E-05	-1,81	1,22E-02					No encontrado
59	2011mTn5STM.1.01.C09	cromosoma	SMc03883	-1,76	1,42E-03	-1,92	1,21E-02	1	<i>mtgA</i>	monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylase	Cell wall/membrane biogenesis	SI
60	2011mTn5STM.4.11.A02	cromosoma	SMc04038	-2,10	6,68E-04	-1,49	2,57E-02	1		putative partial transposase for ISRM17 protein	Replication, recombination and repair	No analizado
61	2011mTn5STM.4.09.B01	cromosoma	SMc03980	-1,64	4,04E-04	-1,87	8,46E-05	1		hypothetical protein	function unknow	SI
62	2011mTn5STM.3.03.H11	cromosoma	SMc02707	-1,76	8,64E-04	-1,73	9,76E-03	1		hypothetical protein	general prediction only	SI
63	2011mTn5STM.2.08.G07	pSymB	Smb21263	-1,73	9,85E-05	-1,74	4,31E-02	1		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter permease protein	Amino acid transport and metabolism	SI
64	2011mTn5STM.4.07.G05	cromosoma	Smc03007	-1,58	8,23E-06	-1,83	5,44E-03	6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI

N°	Mutante	Replicon	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserc.	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	3dpi
65	2011mTn5STM.1.09.C10	pSymB	Smb21260	-1,53	4,39E-04	-1,83	3,01E-02	1		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter ATP-binding protein	Amino acid transport and metabolism	SI
66	2011mTn5STM.5.10.G01	cromosoma	SMc00294	-1,26	7,45E-03	-2,02	1,00E-02	1		aminotransferase	Amino acid transport and metabolism	SI
67	2011mTn5STM.2.08.B03	pSymB	Smb21262	-1,88	2,51E-03	-1,32	1,96E-02	3		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter permease protein	Amino acid transport and metabolism	SI
68	2011mTn5STM.4.13.F07	cromosoma	SMc03004			-1,58	9,86E-03	4	<i>mcpE</i>	putative chemoreceptor (methyl-accepting chemotaxis protein)	cell motility	otra inserción
69	2011mTn5STM.3.02.E03	cromosoma	SMc03007	-2,27	1,42E-02	-0,84	7,74E-04	6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI
70	2011mTn5STM.3.06.F10	cromosoma	SMc02562	-1,56	8,68E-03	-1,54	2,06E-02	2	<i>pckA</i>	phosphoenolpyruvate carboxykinase	Energy production and conversion	SI
71	2011mTn5STM.1.08.E05	cromosoma	SMc04331	-1,98	2,00E-03	-1,10	3,14E-02	1	<i>mtbC</i>	putative dimethylamine corrinoid protein	general prediction only	SI
72	2011mTn5STM.3.06.B12	cromosoma	SMc03007	-1,40	1,43E-03	-1,67	1,27E-03	6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI
73	2011mTn5STM.4.01.B05	cromosoma	SMc02407	-1,70	3,74E-03	-1,35	1,16E-03	1		hypothetical protein	function unknow	SI
74	2011mTn5STM.4.03.G12	cromosoma	SMc03047	-1,40	7,45E-04	-1,65	1,89E-02	1	<i>flgE</i>	flagellar hook protein FlgE	cell motility	SI
75	2011mTn5STM.2.02.B03	cromosoma	SMc00090	-1,45	1,08E-03	-1,57	8,64E-03	2	<i>cysN</i>	putative sulfate adenylate transferase cysteine biosynthesis protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
76	2011mTn5STM.1.08.D10	cromosoma	SMc00566			-1,51	1,22E-02	2		hypothetical protein	Not in cogs	No encontrado
77	2011mTn5STM.1.10.B08	pSymB	Smb21261	-1,35	4,56E-03	-1,65	1,90E-02	1		putative mureinpeptideoligopeptide ABC transporter periplasmic solute-binding protein	Amino acid transport and metabolism	SI
78	2011mTn5STM.3.09.H10	cromosoma	SMc00090	-1,49	9,88E-05			2	<i>cysN</i>	putative sulfate adenylate transferase cysteine biosynthesis protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
79	2011mTn5STM.4.03.D12	cromosoma	SMc00775	-1,59	5,09E-03	-1,32	1,80E-03	2	<i>fbpB</i>	putative IRON(III) permease protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
80	2011mTn5STM.3.08.G12	cromosoma	SMc03849	-1,04	1,38E-02	-1,83	2,69E-02	1	<i>ccmC</i>	putative HEME exporter C (cytochrome C-type biogenesis protein) transmembrane	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	SI
81	2011mTn5STM.4.12.A10	cromosoma	SMc03048	-1,46	7,15E-03	-1,39	2,04E-04	2	<i>flgK</i>	flagellar hook-associated protein FlgK	cell motility	SI
82	2011mTn5STM.3.13.G06	pSymB	Smb20652	-1,37	3,01E-03	-1,42	1,11E-02	1	<i>asnB</i>	putative asparagine synthetase protein	Amino acid transport and metabolism	SI
83	2011mTn5STM.3.01.G12	cromosoma	SMc04245	-1,62	7,31E-05	-1,16	4,35E-02	1	<i>znuA</i>	high-affinity zinc uptake system ABC transporter protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
84	2011mTn5STM.4.08.H09	cromosoma	SMc03004	-1,56	6,07E-03	-1,20	1,50E-02	4	<i>mcpE</i>	putative chemoreceptor (methyl-accepting chemotaxis protein)	cell motility	SI
85	2011mTn5STM.4.03.D06	NS		-1,37	6,55E-03	-1,39	5,80E-03					No encontrado
86	2011mTn5STM.4.14.G12	NS		-1,42	1,10E-04	-1,31	3,34E-05					SI
87	2011mTn5STM.5.13.E03	NS		-1,56	2,12E-06	-1,10	1,74E-02					SI
88	2011mTn5STM.4.08.A01	cromosoma	SMc02274	-1,42	4,21E-03	-1,23	4,46E-02	2	<i>rkpU</i>	capsule polysaccharide exporter protein	Not in cogs	otra inserción
89	2011mTn5STM.1.08.D04	cromosoma	SMc03048	-1,36	3,89E-03	-1,28	7,33E-02*	2	<i>flgK</i>	flagellar hook-associated protein FlgK	cell motility	SI
90	2011mTn5STM.4.13.E11	pSymB	Smb20529	-1,31	1,17E-03	-1,30	1,61E-03	1		hypothetical protein	Function unknown	SI
91	2011mTn5STM.1.08.D01	cromosoma	SMc03027	-1,53	1,54E-02	-1,06	3,43E-02	2	<i>flgB</i>	flagellar basal body rod protein FlgB	cell motility	SI
92	2011mTn5STM.4.13.H08	cromosoma	SMc03007	-1,28	6,93E-04			6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	SI

N°	Mutante	Replicon	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserc.	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	3dpi
93	2011mTn5STM.3.13.H11	cromosoma	SMc03007	-1,34	2,43E-03	-1,19	2,64E-02	6	<i>cheA</i>	chemotaxis protein (sensory transduction histidine kinase)	cell motility	Si
94	2011mTn5STM.1.08.H02	cromosoma	SMc03046	-1,46	7,89E-03	-1,01	3,51E-02	1	<i>rem</i>	putative transcription regulator protein	Signal transduction mechanisms	Si
95	2011mTn5STM.3.11.D08	cromosoma	SMc03004	-1,22	6,36E-03			4	<i>mcpE</i>	putative chemoreceptor (methyl-accepting chemotaxis protein)	Cell motility	No analizado
96	2011mTn5STM.2.12.G07	cromosoma	SMc03023	-1,29	1,14E-03	-1,13	3,34E-02	1		hypothetical protein	Coenzyme transport and metabolism	Si
97	2011mTn5STM.2.04.E04	cromosoma	SMc00406	-1,13	1,92E-02	-1,27	1,28E-02	1		4FE-4S ferredoxin iron-sulfur binding-domain containing protein	Energy production and conversion	Si
98	2011mTn5STM.4.12.C09	cromosoma	SMc00726	-1,11	5,09E-03	-1,28	3,27E-02	1	<i>tlpA</i>	putative thiol:disulfide interchange redox-active center transmembrane protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Si
99	2011mTn5STM.2.11.B08	NS				-1,18	6,89E-02*					No analizado
100	2011mTn5STM.4.03.B06	cromosoma	SMc00781	-0,90	6,00E-02*	-1,44	7,55E-03	1	<i>ioIA</i>	putative malonic semialdehyde oxidative decarboxylase protein	Energy production and conversion	Si
101	2011mTn5STM.2.09.H08	NS		-1,38	3,64E-03	-0,96	1,34E-02					Si
102	2011mTn5STM.4.13.C12	cromosoma	SMc01164	-1,18	6,74E-05	-1,14	6,62E-03	1		hypothetical protein	Transcription	Si
103	2011mTn5STM.3.11.D06	cromosoma	SMc03032	-0,90	3,65E-02	-1,41	5,52E-02*	1		flagellar basal body P-ring protein	Cell motility	No analizado
104	2011mTn5STM.2.07.F11	cromosoma	SMc00012	-1,26	1,26E-03	-1,00	6,09E-03	1	<i>ctaG</i>	cytochrome C oxidase assembly protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Si
105	2011mTn5STM.4.13.D12	cromosoma	SMc02229	-1,10	2,83E-03	-1,12	1,45E-02	1		putative acyl-CoA dehydrogenase protein	Lipid transport and metabolism	Si
106	2011mTn5STM.4.03.D02	cromosoma	SMc03220	-0,85	2,31E-02	-1,35	1,26E-02	2		ribosomal RNA-23S	RNA	otra inserción
107	2011mTn5STM.4.12.A09	cromosoma	SMc02181	-1,01	4,00E-03	-1,19	2,64E-02	1	<i>putA</i>	bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	Amino acid transport and metabolism	Si
108	2011mTn5STM.3.10.D06	cromosoma	SMc02611	-0,93	2,74E-03	-1,26	1,36E-01*	1	<i>glxC</i>	putative oxidoreductase protein	Amino acid transport and metabolism	No encontrado
109	2011mTn5STM.4.12.C04	pSymA	SMA1465	-0,96	7,13E-04	-1,19	1,50E-02	1		putative ABC transporter permease	Amino acid transport and metabolism	Si
110	2011mTn5STM.1.09.F01	pSymB	Smb20724	-1,14	2,10E-03	-1,01	1,19E-02	1		hypothetical protein	Function unknown	No encontrado
111	2011mTn5STM.2.11.D12	cromosoma	SMc00188	-1,36	9,95E-03	-0,77	5,61E-03	2	<i>fbcB</i>	cytochrome B transmembrane protein	Energy production and conversion	No analizado
112	2011mTn5STM.5.04.C03	NS		-0,89	1,79E-02	-1,19	1,64E-02					No encontrado
113	2011mTn5STM.4.07.B08	cromosoma	SMc03220	-0,95	1,18E-02	-1,12	8,82E-03	2	<i>rna23s</i>	ribosomal RNA-23S	RNA	Si
114	2011mTn5STM.2.09.A02	cromosoma	SMc02109	-0,84	6,88E-02*	-1,23	7,73E-03	1	<i>clpA</i>	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	Si
115	2011mTn5STM.4.09.E11	cromosoma	SMc02875	-0,82	2,39E-03	-1,23	4,20E-02	1		hypothetical protein	Carbohydrate transport and metabolism	No encontrado
116	2011mTn5STM.3.13.C01	cromosoma	SMc03008			-1,00	1,13E-03	1	<i>cheW1</i>	chemotaxis protein	Cell motility	No encontrado
117	2011mTn5STM.3.07.G10	NS		-0,85	4,89E-03	-1,15	9,09E-03					Si
118	2011mTn5STM.2.10.G05	cromosoma	SMc03140	-1,06	4,03E-02	-0,94	2,90E-02	1		putative transcription regulator protein	Transcription	Si
119	2011mTn5STM.2.01.H08	cromosoma	SMc03021	-1,03	7,63E-03	-0,96	6,68E-02*	2	<i>fliM</i>	flagellar motor switch transmembrane protein	cell motility	Si
120	2011mTn5STM.4.14.A09	NS		-0,99	2,71E-04	-0,99	1,81E-02					Si
121	2011mTn5STM.4.01.F10	cromosoma	SMc03021	-1,18	1,83E-04	-0,77	1,58E-01*	2	<i>fliM</i>	flagellar motor switch transmembrane protein	cell motility	Si
122	2011mTn5STM.2.14.E09	NS		-1,18	4,51E-03	-0,76	4,62E-02					Si
123	2011mTn5STM.1.11.A06	cromosoma	SMc02228	-1,09	7,31E-03	-0,83	4,73E-02	1	<i>fadA</i>	acetyl-CoA acetyltransferase	Lipid transport and metabolism	No analizado

N°	Mutante	Replicon	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserc.	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	3dpi
124	2011mTn5STM.4.09.B10	cromosoma	SMc04333	-1,01	1,60E-02	-0,91	2,33E-02	1		hypothetical protein	Not in cogs	Si
125	2011mTn5STM.3.02.D02	cromosoma	SMc02363	-0,90	1,28E-01*	-1,01	1,85E-01*	1	<i>cycK</i>	cytochrome C-type biogenesis transmembrane protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	SI
126	2011mTn5STM.3.10.C01	cromosoma	SMc01842			-0,95	3,60E-02	1		putative methyltransferase transcription regulator protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	No encontrado
127	2011mTn5STM.4.11.C06	cromosoma	SMc03933	-1,10	2,27E-02	-0,76	4,21E-02	1	<i>soxB2</i>	putative sarcosine oxidase subunit B protein	Amino acid transport and metabolism	No analizado
128	2011mTn5STM.3.11.E07	cromosoma	SMc04340	-1,03	2,65E-02	-0,82	8,18E-02*	1		putative oxidoreductase protein	Amino acid transport and metabolism	No analizado
129	2011mTn5STM.3.01.C02	cromosoma	SMc04093			-0,92	4,33E-04	1	<i>acsA1</i>	acetyl-CoA synthetase	Lipid transport and metabolism	Si
130	2011mTn5STM.3.07.D11	pSymB	Smb20994	-0,75	4,21E-03	-1,09	3,26E-02	1		Entre Smb20995 y Smb20994		No encontrado
131	2011mTn5STM.3.05.C11	pSymB	Smb20079	-0,92	8,73E-03			1		putative hemolysin-adenylate cyclase protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	SI
132	2011mTn5STM.2.10.G12	pSymB	Smb21570	-0,82	3,61E-02	-1,01	1,05E-01*	1		dentro de SMB_asRNA_2774		No encontrado
133	2011mTn5STM.4.04.B01	cromosoma	SMc03269	-0,95	7,24E-02*	-0,85	2,70E-02	1		putative peptide-binding periplasmic ABC transporter protein	Amino acid transport and metabolism	Si
134	2011mTn5STM.5.05.G03	cromosoma	SMc02274	-0,78	1,42E-01*	-1,02	3,38E-02	2	<i>rkpU</i>	capsule polysaccharide exporter protein	Not in cogs	Si
135	2011mTn5STM.2.08.E08	pSymB	Smb20757	-1,02	4,63E-03	-0,75	1,46E-01*	1	<i>bhbA</i>	methylmalonyl-CoA mutase	Lipid transport and metabolism	No encontrado
136	2011mTn5STM.2.09.D12	pSymB	Smb20030	-0,96	1,03E-03	-0,80	2,15E-02	1	<i>sig</i>	RNA polymerase sigma factor SigJ	transcription	No encontrado
137	2011mTn5STM.5.13.F02	NS		-0,94	2,61E-03	-0,81	3,97E-02					Si
138	2011mTn5STM.3.12.B01	cromosoma	SMc02610	-0,91	4,53E-04	-0,82	5,42E-03	1	<i>glxB</i>	putative amidotransferase protein	Amino acid transport and metabolism	No encontrado
139	2011mTn5STM.4.08.A06	cromosoma	SMc01120	-0,75	8,20E-04	-0,97	1,34E-01*	1		hypothetical protein	Not in cogs	No encontrado
140	2011mTn5STM.4.03.D09	cromosoma	SMc03844	-0,82	4,86E-02	-0,88	2,20E-02	1		hypothetical protein	Not in cogs	No encontrado
141	2011mTn5STM.5.04.B04	cromosoma	Smelc775	-0,96	1,28E-01*	-0,72	9,50E-02*	1		SMc_sRNA_355		No encontrado
142	2011mTn5STM.4.08.E08	cromosoma	SMc01104	-0,82	1,16E-02	-0,86	7,58E-02*	2	<i>mcpX</i>	chemoreceptor methyl-accepting chemotaxis transmembrane protein	Cell motility	No encontrado
143	2011mTn5STM.3.02.E01	NS		-0,84	1,20E-03	-0,80	9,84E-02*					No encontrado
144	2011mTn5STM.5.04.B02	cromosoma	SMc01104	-0,79	2,69E-02	-0,85	2,70E-02	2	<i>mcpX</i>	chemoreceptor methyl-accepting chemotaxis transmembrane protein	Cell motility	No encontrado
145	2011mTn5STM.2.09.A04	cromosoma	SMc00188	-0,86	5,04E-02*	-0,77	3,57E-02	2	<i>fbcB</i>	cytochrome B transmembrane protein	Energy production and conversion	No encontrado
146	2011mTn5STM.2.02.A11	cromosoma	SMc03027	-0,80	1,54E-02	-0,84	1,32E-01*	2	<i>flgB</i>	flagellar basal body rod protein FlgB	cell motility	Si
147	2011mTn5STM.4.12.H02	cromosoma	SMc02606	-0,72	5,33E-04	-0,91	9,18E-03	1	<i>soxA1</i>	putative sarcosine oxidase alpha subunit transmembrane protein	Amino acid transport and metabolism	SI
148	2011mTn5STM.5.14.C03	NS		-0,74	3,39E-03	-0,88	1,08E-03					SI
149	2011mTn5STM.2.11.E01	cromosoma	SMc02311	-0,73	9,53E-03	-0,86	2,14E-03	1		Maf-like protein	Cell cycle control, mitosis and meiosis	No analizado

N°	Mutante	Replicon	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserc.	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	3dpi
150	2011mTn5STM.2.02.G01	NS		-0,82	7,44E-03	-0,77	1,53E-03					No encontrado
151	2011mTn5STM.4.13.D04	pSymB	Smb20723	-0,86	9,69E-03	-0,71	3,90E-03	1		putative iron ABC transporter periplasmic solute-binding protein precursor	Inorganic ion transport and metabolism	SI
152	2011mTn5STM.2.12.C12	cromosoma	SMc03070	-0,76	3,06E-03	-0,81	5,11E-02*	1	<i>zwf</i>	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Carbohydrate transport and metabolism	SI
153	2011mTn5STM.3.13.A08	cromosoma	SMc00566	-0,83	1,28E-02	-0,73	4,81E-02	2		hypothetical protein	Not in cogs	No encontrado
154	2011mTn5STM.3.10.A02	pSymB	Smb20211	-0,71	9,15E-02*	-0,84	1,51E-01*	1		putative transcriptional regulator protein	transcription	No encontrado
155	2011mTn5STM.4.06.F11	pSymB	Smb20725	-0,77	8,90E-03	-0,77	4,48E-02	1		hypothetical protein	Not in cogs	No encontrado
156	2011mTn5STM.3.04.C12	cromosoma	SMc02986	-0,71	5,87E-02*	-0,78	1,68E-02	1		hypothetical protein	General function prediction only	No encontrado
157	2011mTn5STM.4.07.B07	pSymB	Smb20721			-0,72	2,01E-02	1		putative two-component sensor histidine kinase protein	Signal transduction mechanisms	No encontrado

All. Tabla 2. Lista de mutantes de *S. meliloti* afectados positivamente en la colonización de rizósferas de plantas de alfalfa 7 d.p.i.

Los mutantes se encuentran ordenados por orden decreciente de valor M promedio (promedio no mostrado). Los mutantes que sólo muestran valores asociados a la firma K o H sólo pudieron ser analizados por esa firma. NS: Mutante cuyo sitio de inserción no ha sido secuenciado. * indica valor $p > 0,05$. La columna inserciones cuenta el número de veces que ese gen se encuentra repetido en la misma lista. La columna "3 d.p.i." indica el comportamiento de ese mutante en los experimentos de colonización de plantas de alfalfa 3 d.p.i. "SI" indica que ese mismo mutante se encontró afectado a los 7 d.p.i. "No encontrado" indica que ese mutante no se encontró afectado a los 7 d.p.i.. "otra inserción" indica que ese mutante no fue encontrado afectado a los 7 d.p.i. pero sí se encontró otro mutante afectado en el mismo gen. "No analizado" indica que ese mutante no fue analizado a los 3 d.p.i. El producto génico y la categoría funcional fueron extraídos de la base de datos Rhizobase (Sección Materiales y métodos II.6). UR: Unidad repetitiva.

Afectados positivamente 7 d.p.i.

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserc.	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	3 dpi
1	2011mTn5STM.1.09.D03	cromosoma	SMc02352	1,21	6,95E-04	1,36	5,98E-03	1		putative glutamine synthetase protein	Not in COGs	SI
2	2011mTn5STM.3.06.H01	NS		1,22	7,14E-03	1,27	7,02E-04	1				NO
3	2011mTn5STM.1.05.B11	pSymB	Smb21535	1,47	1,34E-03	0,97	5,39E-05	1		putative transcriptional regulator, lysR family protein	Transcription	SI
4	2011mTn5STM.2.02.C02	cromosoma	SMc01412	1,41	2,83E-03	1,03	3,56E-02	2		hypothetical protein	function unknow	SI
5	2011mTn5STM.3.07.H01	NS		1,11	4,49E-03	1,28	7,96E-03	1				NO
6	2011mTn5STM.1.13.E06	pSymB	Smb21662	1,13	1,79E-03	1,20	5,58E-03	1	<i>exl2</i>	putative periplasmic protein	Replication, recombination and repair	NO
7	2011mTn5STM.1.07.C05	cromosoma	SMc01212	1,13	1,59E-05	1,14	9,80E-03	1		putative transport transmembrane protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
8	2011mTn5STM.1.08.G01	cromosoma	SMc00159	0,98	2,55E-02	1,25	2,49E-03	1		putative signal peptide protein	Intracellular trafficking and secretion	SI
9	2011mTn5STM.2.14.A03	NS		1,06	1,31E-03	1,17	1,71E-02	1				SI
10	2011mTn5STM.4.13.E08	pSymA	intergenico	1,11	9,92E-04	1,12	2,64E-02	1				No
11	2011mTn5STM.2.07.B10	pSymA	SMa1662	1,12	2,04E-04	1,09	2,33E-02	1		Cation/multidrug efflux pump	defense mechanism	SI
12	2011mTn5STM.4.14.D05	NS		1,04	2,29E-03	1,15	2,04E-02	1				SI
13	2011mTn5STM.1.05.B07	cromosoma	SMc02376	1,18	2,42E-03	0,97	6,80E-03	1		putative heat shock protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	SI
14	2011mTn5STM.1.03.D04	pSymA	SMa1531	0,93	2,54E-02	1,22	5,36E-03	1	<i>nuoC2</i>	NuoC2 NADH I chain C	Energy production and conversion	SI
15	2011mTn5STM.1.13.C08	pSymA	SMa1229	1,03	3,73E-03	1,06	4,70E-03	1	<i>fixL</i>	FixL oxygen regulated histidine kinase	Signal transduction mechanisms	NO
16	2011mTn5STM.3.13.F10	cromosoma	SMc03113	0,98	2,82E-03	1,11	2,76E-02	1	<i>TRm5N</i>	transposase		NO
17	2011mTn5STM.1.06.F06	pSymB	Smb21281	0,94	2,15E-03	1,14	3,14E-02	1		xanthineuracil permease family protein	General prediction only	SI
18	2011mTn5STM.1.06.B07	pSymB	Smb21087	1,13	4,48E-03	0,93	9,81E-03	1	<i>traA2</i>	putative conjugal transfer protein	Replication, recombination and repair	SI
19	2011mTn5STM.4.13.E06	cromosoma	SMc00104	1,02	1,46E-03	1,04	1,20E-02	1		hypothetical protein	General prediction only	No analizado
20	2011mTn5STM.2.07.C06	pSymB		0,91	2,89E-04	1,14	5,20E-03	1		Intergénico		SI
21	2011mTn5STM.1.05.D04	cromosoma	UR	0,86	2,54E-02	1,15	4,76E-03	1		Unidad repetitiva AL581688		SI
22	2011mTn5STM.1.06.H06	cromosoma	SMc02273	0,93	4,22E-03	1,09	1,85E-02	1	<i>rkpA</i>	fatty acid synthase transmembrane protein	Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	SI
23	2011mTn5STM.2.02.C04	pSymA	SMa1301	1,00	2,89E-03	0,99	3,02E-03	1		Permease	not in cogs	SI
24	2011mTn5STM.1.14.E04	NS		0,81	1,78E-03	1,18	8,44E-03	1				NO
25	2011mTn5STM.1.07.D07	pSymB	Smb21495	0,96	2,25E-04	1,01	3,08E-03	1		putative protease protein	not in cogs	SI
26	2011mTn5STM.1.13.F10	pSymB	Smb21287	1,01	7,66E-03	0,95	3,23E-02	1	<i>xdhB1</i>	putative xanthine dehydrogenase protein	Nucleotide transport and metabolism	NO
27	2011mTn5STM.1.04.E09	pSymB	Intergenico	0,88	1,24E-02	1,08	2,64E-02	1			Intergénico	SI
28	2011mTn5STM.1.09.G08	pSymB	Smb20385	0,90	4,19E-03	1,06	6,19E-03	1		hypothetical protein	not in cogs	SI
29	2011mTn5STM.3.04.C03	NS				0,97	9,83E-03	1				SI
30	2011mTn5STM.3.12.E12	pSymA	SMa_TSS0842	1,02	1,95E-04	0,91	4,66E-02	1		SMa_TSS0842		SI
31	2011mTn5STM.1.02.E04	pSymB	Smb21189	0,96	1,85E-02	0,95	3,86E-02	1		putative glycosyltransferase protein	Cell wall/membrane biogenesis	SI
32	2011mTn5STM.3.13.C05	pSymA	SMa2103	0,97	6,34E-03	0,94	1,55E-04	1		oxidoreductase	Not in COGs	NO

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserc.	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	3 dpi
33	2011mTn5STM.2.10.C09	cromosoma	SMc00047			0,95	3,50E-02	1	<i>bla</i>	putative BETA-lactamase signal peptide protein	Defense mechanism	NO
34	2011mTn5STM.1.13.E05	pSymB	Smb21221	0,91	7,20E-04	0,97	5,62E-03	1		putative sugar uptake ABC transporter periplasmic solute-binding protein precursor	Carbohydrate transport and metabolism	NO
35	2011mTn5STM.2.11.G07	pSymB	Smb20128	1,01	8,75E-04	0,86	2,01E-02	1		putative deaminase protein	Nucleotide transport and metabolism	No analizado
36	2011mTn5STM.3.02.F08	pSymA	SMa1236	0,97	2,67E-02	0,91	3,64E-02	1	<i>napA</i>	nitrate reductase	Energy production and conversion	SI
37	2011mTn5STM.2.02.D02	cromosoma	SMc_asRNA_1713	0,98	2,52E-02	0,87	1,32E-02	1		SMc_asRNA_1713		SI
38	2011mTn5STM.2.06.C09	pSymB	Smb21343			0,92	3,28E-02	1		putative sugar uptake ABC transporter permease protein	Carbohydrate transport and metabolism	NO
39	2011mTn5STM.1.05.A05	pSymB	Smb20969	1,03	7,81E-03	0,82	2,80E-04	1		putative sugar uptake ABC transporter permease protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
40	2011mTn5STM.1.12.G07	cromosoma	SMc01821	0,95	1,56E-02	0,89	4,76E-02	1	<i>dht</i>	dihydropyrimidinase	Nucleotide transport and metabolism	SI
41	2011mTn5STM.1.01.F04	NS		0,84	2,34E-02	0,97	4,99E-02	1				NO
42	2011mTn5STM.1.05.E12	cromosoma	SMc01663	1,00	1,55E-02	0,79	8,00E-04	1		putative oxidoreductase protein	Amino acid transport and metabolism	SI
43	2011mTn5STM.1.13.G11	pSymB	Smb20494			0,89	5,01E-02*	1		putative transcriptional regulator protein	Transcription	NO
44	2011mTn5STM.2.01.G09	pSymB	Smb21291	0,91	2,89E-04	0,86	2,95E-03	1		putative transcriptional regulator, lysR family protein	Transcription	SI
45	2011mTn5STM.3.01.E10	pSymB	Smb21584	0,90	9,77E-04	0,88	1,10E-02	1		hypothetical protein	not in cogs	SI
46	2011mTn5STM.2.14.E07	NS		0,97	4,56E-03	0,80	1,31E-02	1				SI
47	2011mTn5STM.1.13.F12	cromosoma	SMc04205	0,89	5,40E-04	0,87	3,79E-03	1		putative IRON/HEME transport protein	Inorganic ion transport and metabolism	NO
48	2011mTn5STM.4.02.C12	pSymB	Smb20775	0,90	1,04E-03	0,87	2,04E-02	1		TonB-dependent receptor protein	General prediction only	SI
49	2011mTn5STM.3.01.B07	cromosoma	AL591688	0,97	1,91E-03	0,79	4,49E-02	1				NO
50	2011mTn5STM.1.11.F05	pSymA	SMa0383			0,88	6,70E-02*	1		hypothetical protein	Carbohydrate transport and metabolism	No analizado
51	2011mTn5STM.3.11.B09	cromosoma	SMc01849	1,01	1,85E-02	0,73	1,96E-03	1		putative hydrolase transmembrane protein	Defense mechanisms	No analizado
52	2011mTn5STM.3.05.D03	cromosoma	SMc01051	1,03	2,39E-02	0,70	2,15E-02	1	<i>mazG</i>	nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase	General function prediction only	SI
53	2011mTn5STM.3.14.C08	NS		0,82	3,65E-04	0,91	6,09E-04	1				SI
54	2011mTn5STM.4.14.C08	NS		0,84	7,46E-03	0,89	2,77E-02	1				SI
55	2011mTn5STM.1.09.G05	cromosoma	SMc04128	0,95	5,68E-04	0,77	2,67E-02	2		putative heavy metal transporting ATPase protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
56	2011mTn5STM.3.13.B07	cromosoma	SMc02890	0,87	7,15E-04	0,83	3,46E-03	1		putative outer membrane receptor protein	Inorganic ion transport and metabolism	NO
57	2011mTn5STM.2.04.B10	pSymA	SMa_asRNA_171	0,90	2,78E-02	0,80	1,47E-02	1				SI
58	2011mTn5STM.3.08.C07	cromosoma	Intergenico	0,89	3,83E-02	0,80	1,29E-02	1		Intergénico		SI
59	2011mTn5STM.1.11.D10	pSymB	Smb21337			0,85	1,58E-02	1		iron-sulfur-binding protein	Energy production and conversion	No analizado
60	2011mTn5STM.1.12.C07	pSymA	SMa0803	0,82	9,91E-05	0,87	2,33E-02	1		ABC transporter, ATP-binding protein	Amino acid transport and metabolism	SI
61	2011mTn5STM.4.14.B06	NS		0,89	5,29E-04	0,79	7,34E-03	1				SI

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserc.	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	3 dpi
62	2011mTn5STM.3.12.C11	pSymB	SMB20941	0,84	1,32E-03			1	<i>exsA</i>	MsbA-like saccharide exporting ABC transporter ATP-binding/permease	Defense mechanisms	SI
63	2011mTn5STM.1.03.D03	pSymB	SMB20349	0,87	5,85E-03	0,81	1,98E-02	1		sugar ABC transporter	Carbohydrate transport and metabolism	SI
64	2011mTn5STM.1.07.E08	pSymB	SMB20320			0,84	4,88E-02	1		TRAP-type large permease component	Carbohydrate transport and metabolism	NO
65	2011mTn5STM.1.03.F06	cromosoma	SMc01977	0,79	5,68E-03	0,86	1,95E-02	1		putative sugar-binding periplasmic ABC transporter protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
66	2011mTn5STM.1.14.E06	pSymA		0,84	8,17E-03	0,81	2,47E-03	1		Intergénico		SI
67	2011mTn5STM.4.04.D08	pSymA	SMA1782	0,82	1,65E-02	0,82	6,65E-03	1		LysR family transcriptional regulator	Transcription	No
68	2011mTn5STM.1.08.F08	pSymB	SMB20697	0,83	2,96E-04	0,81	2,71E-03	1		putative peptidase, arginine utilization protein RocB	Amino acid transport and metabolism	SI
69	2011mTn5STM.3.01.G03	cromosoma	SMc00770	0,85	4,95E-03	0,79	1,03E-02	1	<i>potF</i>	putrescine-binding periplasmic protein	Amino acid transport and metabolism	SI
70	2011mTn5STM.1.02.C03	NS		0,84	5,55E-04	0,80	7,64E-03	1				SI
71	2011mTn5STM.4.08.D05	pSymB	SMB20481	0,71	1,92E-02	0,92	3,35E-02	1	<i>asnO</i>	putative asparagine synthetase (glutamine amidotransferase) protein	Amino acid transport and metabolism	No
72	2011mTn5STM.1.05.G07	pSymA	SMA1597	0,83	2,68E-02	0,79	7,09E-04	1		Pilus assembly chaperone	cell motility	SI
73	2011mTn5STM.1.06.D10	pSymA	SMA1478			0,80	5,39E-03	1		putative methyltransferase	Coenzyme transport and metabolism	NO
74	2011mTn5STM.1.03.E03	NS		0,71	1,70E-02	0,90	1,67E-02	1				SI
75	2011mTn5STM.2.13.E09	pSymB	SMB20541	0,77	1,34E-03	0,84	1,72E-02	1		putative protein in ISRM14	Replication, recombination and repair	NO
76	2011mTn5STM.1.08.G07	cromosoma	SMc_sRNA_241	0,77	1,57E-02	0,83	7,71E-04	1		SMc_sRNA_241		SI
77	2011mTn5STM.2.02.E05	cromosoma	SMc01412	0,84	3,17E-02	0,75	4,73E-02	2		hypothetical protein	function unknow	SI
78	2011mTn5STM.1.03.F07	cromosoma	SMc04222	0,82	1,04E-02	0,75	1,72E-03	1		hypothetical protein	function unknow	SI
79	2011mTn5STM.1.02.D07	cromosoma	SMc01373	0,80	2,61E-02	0,75	3,78E-02	1	<i>dinP</i>	DNA polymerase IV	Replication, recombination and repair	SI
80	2011mTn5STM.1.07.D06	cromosoma	SMc02300	0,76	1,95E-02	0,80	2,25E-02	1	<i>TRm30.4</i>	Transposase		NO
81	2011mTn5STM.4.11.B03	pSymB	SMB20805	0,78	2,25E-03			1		putative glycosyltransferase protein	not in cogs	No
82	2011mTn5STM.1.12.F06	pSymB	SMB20390	0,74	2,17E-04	0,79	4,15E-03	1		hypothetical protein	Cell wall/membrane biogenesis	SI
83	2011mTn5STM.4.14.F08	NS		0,74	6,08E-04	0,79	2,16E-02	1				SI
84	2011mTn5STM.1.14.F07	pSymA	SMA0892	0,79	6,33E-03	0,74	3,64E-02	1	<i>dnaE3</i>	DnaE3 DNA polymerase III alpha chain	Replication, recombination and repair	SI
85	2011mTn5STM.1.05.F05	pSymB	SMB20363			0,76	3,87E-02	1		putative iron ABC transporter ATP-binding protein	Amino acid transport and metabolism	SI
86	2011mTn5STM.1.05.D10	pSymB	SMB20981			0,76	3,38E-02	1		putative C4-dicarboxylate transporter periplasmic solute-binding protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
87	2011mTn5STM.3.07.C05	cromosoma	intergénico	0,74	4,82E-03	0,75	5,61E-03	1				NO
88	2011mTn5STM.2.04.F04	cromosoma	SMc00783	0,73	3,04E-02	0,76	3,48E-02	1		hypothetical protein	Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	SI
89	2011mTn5STM.3.14.F04	NS		0,71	3,08E-03	0,76	9,12E-04	1				SI

N°	Mutante	Replicón	ID	Valor M - K	t-test - K	Valor M - H	t-test - H	Inserc.	Símbolo	Producto génico	Categoría funcional	3 dpi
90	2011mTn5STM.2.08.D08	pSymB	SMb21644	0,76	2,01E-02	0,71	1,28E-02	1		putative ABC transporter ATP-binding protein	General function prediction only	NO
91	2011mTn5STM.3.02.B09	pSymA	SMA1573	0,75	9,55E-03	0,72	1,34E-02	1	<i>cpaE2</i>	CpaE2 pilus assembly protein	Intracellular trafficking and secretion	NO
92	2011mTn5STM.1.02.E09	cromosoma	SMc02021	0,74	3,65E-05	0,72	4,23E-02	1		putative periplasmic binding ABC transporter protein	Carbohydrate transport and metabolism	SI
93	2011mTn5STM.1.04.F05	cromosoma	SMc04128			0,72	2,80E-02	2		putative heavy metal transporting ATPase protein	Inorganic ion transport and metabolism	SI
94	2011mTn5STM.1.02.E08	cromosoma	SMc02843			0,72	9,34E-02*	1	<i>nth</i>	endonuclease III protein	Replication, recombination and repair	NO
95	2011mTn5STM.1.14.E05	cromosoma	SMc00373	0,71	3,27E-04	0,71	5,11E-03	1		hypothetical protein	Not in COGs	SI

Referencias

- Abbas BA, Vineetha K, Prasad CK, Vij N, Hassani R & Randhawa GS. 2002. Symbiotic characteristics of cysteine and methionine auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. *Indian journal of experimental biology* 40: 1121-1130.
- Abdel-Lateif K, Bogusz D & Hocher V. 2012. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria. *Plant Signal Behav* 7: 636-641.
- Albareda M, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M, Temprano F & Rodríguez-Navarro DN. 2006. Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS microbiology letters* 259: 67-73.
- Albus U, Baier R, Holst O, Pühler A & Niehaus K. 2001. Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytologist* 151: 597-606.
- Althabegoiti MJ, Lopez-Garcia SL, Piccinetti C, Mongiardini EJ, Perez-Gimenez J, Quelas JI, Peticari A & Lodeiro AR. 2008. Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean. *FEMS Microbiol Lett* 282: 115-123.
- Ames P & Bergman K. 1981. Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 148: 728-729.
- Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G & Battistoni A. 2007. High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infection and Immunity* 75: 5867-5876.
- Ampe F, Kiss E, Sabourdy F & Batut J. 2003. Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol* 4: R15.
- Angelichio MJ & Camilli A. 2002. In vivo expression technology. *Infect Immun* 70: 6518-6523.
- Araujo RS, Robleto EA & Handelsman J. 1994. A hydrophobic mutant of *Rhizobium etli* altered in nodulation competitiveness and growth in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1430-1436.
- Armitage JP & Schmitt R. 1997. Bacterial chemotaxis: *Rhodobacter sphaeroide* and *Sinorhizobium meliloti* - variations on a theme? *Microbiology* 143: 3671-3682.
- Attmannspacher U, Scharf B & Schmitt R. 2005. Control of speed modulation (chemokinesis) in the unidirectional rotary motor of *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular microbiology* 56: 708-718.
- Barloy-Hubler F, Chéron A, Hellégouarch A & Galibert F. 2004. *Smc01944*, a secreted peroxidase induced by oxidative stresses in *Sinorhizobium meliloti* 1021. *Microbiology* 150: 657-664.
- Barnett MJ, Toman CJ, Fisher RF & Long SR. 2004. A dual-genome Symbiosis Chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 16636-16641.
- Barr M, East AK, Leonard M, Mauchline TH & Poole PS. 2008. In vivo expression technology (IVET) selection of genes of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* A34 expressed in the rhizosphere. *FEMS microbiology letters* 282: 219-227.
- Beatty PH & Good AG. 2011. Future prospects for cereals that fix Nitrogen. *Science* 333: 416-417.

- Becker A, Berges H, Krol E, Bruand C, Ruberg S, Capela D, Lauber E, Meilhoc E, Ampe F, de Bruijn FJ, Fourment J, Francez-Charlot A, Kahn D, Kuster H, Liebe C, Puhler A, Weidner S & Batut J. 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* 17: 292-303.
- Berendsen RL, Pieterse CMJ & Bakker PAHM. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in Plant Science* 17: 478-486.
- Beringer J. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology* 84: 188-198.
- Bertani G. 1951. Studies on lysogeny I.: The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* 1. *Journal of bacteriology* 62: 293.
- Bingle LE, Bailey CM & Pallen MJ. 2008. Type VI secretion: a beginner's guide. *Current Opinion in Microbiology* 11: 3-8.
- Binnewies TT, Motro Y, Hallin PF, Lund O, Dunn D, La T, Hampson DJ, Bellgard M, Wassenaar TM & Ussery DW. 2006. Ten years of bacterial genome sequencing: comparative-genomics-based discoveries. *Functional & integrative genomics* 6: 165-185.
- Biondi EG, Tatti E, Comparini D, Giuntini E, Mocali S, Giovannetti L, Bazzicalupo M, Mengoni A & Viti C. 2009. Metabolic capacity of *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti* strains as determined by phenotype MicroArray analysis. *Appl Environ Microbiol* 75: 5396-5404.
- Bittinger MA, Milner JL, Saville BJ & Handelsman J. 1997. *rosR*, a determinant of nodulation competitiveness in *Rhizobium etli*. *Molecular plant-microbe interactions* 10: 180-186.
- Borjigin N, Furukawa K, Shimoda Y, Tabata S, Sato S, Eda S, Minamisawa K & Mitsui H. 2011. Identification of *Mesorhizobium loti* genes relevant to symbiosis by using signature-tagged mutants. *Microbes Environ* 26: 165-171.
- Boyer HW & Roulland-dussoix D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 41: 459-472.
- Boyer RS & Moore JS. 1977. A fast string searching algorithm. *Communications of the ACM* 20: 762-772.
- Brader G, Compant S, Mitter B, Trognitz F & Sessitsch A. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 27: 30-37.
- Bron PA, Grangette C, Mercenier A, de Vos WM & Kleerebezem M. 2004. Identification of *Lactobacillus plantarum* genes that are induced in the gastrointestinal tract of mice. *Journal of bacteriology* 186: 5721-5729.
- Brunel B, Cleyet-Marel J-C, Normand P & Bardin R. 1988. Stability of *Bradyrhizobium japonicum* inoculants after introduction into soil. *Applied and Environmental Microbiology* 54: 2636-2642.
- Burrill TJ & Hansen R. 1917. Is symbiosis possible between legume bacteria and non-legume plants?
- Cabanes D, Boistard P & Batut J. 2000. Identification of *Sinorhizobium meliloti* genes regulated during symbiosis. *Journal of bacteriology* 182: 3632-3637.
- Cabeza RA, Liese R, Lingner A, von Stieglitz I, Neumann J, Salinas-Riester G, Pommerenke C, Dittert K & Schulze J. 2014. RNA-seq transcriptome profiling reveals that *Medicago truncatula* nodules acclimate N₂ fixation before emerging P deficiency reaches the nodules. *J Exp Bot* 65: 6035-6048.
- Caetano-Anolles G & Gresshoff PM. 1991. Plant genetic control of nodulation. *Annual Reviews in Microbiology* 45: 345-382.

- Caetano-Anolles G, Wall LG, De Micheli AT, Macchi EM, Bauer WD & Favelukes G. 1988a. Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* **86**: 1228-1235.
- Caetano-Anollés G, Crist-Estes DK & Bauer WD. 1988b. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *Journal of bacteriology* **170**: 3164-3169.
- Caetano-Anollés G, Lagares A & Favelukes G. 1989. Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: Dependence on divalent cations and pH. *Plant and Soil* **117**: 67-74.
- Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B & Guilhot C. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature tagged transposon mutagenesis. *Molecular microbiology* **34**: 257-267.
- Camilli A & Mekalanos JJ. 1995. Use of recombinase gene fusions to identify *Vibrio cholerae* genes induced during infection. *Molecular microbiology* **18**: 671-683.
- Camilli A, Beattie DT & Mekalanos JJ. 1994. Use of genetic recombination as a reporter of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **91**: 2634-2638.
- Campbell GRO, Taga ME, Mistry K, Lloret J, Anderson PJ, Roth JR & Walker GC. 2006. *Sinorhizobium meliloti* *bluB* is necessary for production of 5,6-dimethylbenzimidazole, the lower ligand of B12. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 4634-4639.
- Capela D, Filipe C, Bobik C, Batut J & Bruand C. 2006. *Sinorhizobium meliloti* differentiation during symbiosis with alfalfa: A transcriptomic dissection. *Molecular plant-microbe interactions* **19**: 363-372.
- Cassman KG, Dobermann A & Walters DT. 2002. Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* **31**: 132-140.
- Clark FE. 1949. Soil microorganisms and plant roots. *Adv. Agron* **1**: 241-288.
- Cooper JE. 2007. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology* **103**: 1355-1365.
- Coronado C, Zuanazzi JAS, Sallaud C, Quirion J-C, Esnault R, Husson H-P, Kondorosi A & Ratet P. 1995. Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. *Plant physiology* **108**: 533-542.
- Cronk Q, Ojeda I & Pennington RT. 2006. Legume comparative genomics: progress in phylogenetics and phylogenomics. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 99-103.
- Cronk QC. 2006. Legume flowers bear fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 4801-4802.
- Charpentier M & Oldroyd G. 2010. How close are we to nitrogen-fixing cereals? *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 556-564.
- Chen H, Teplitski M, Robinson JB, Rolfe BG & Bauer WD. 2003. Proteomic analysis of Wild-Type *Sinorhizobium meliloti* responses to N-Acyl Homoserine Lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. *Journal of bacteriology* **185**: 5029-5036.
- Cheng H-P & Walker GC. 1998. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* **180**: 5183-5191.

- Chiang SL & Mekalanos JJ. 1998. Use of signature-tagged transposon mutagenesis to identify *Vibrio cholerae* genes critical for colonization. *Molecular microbiology* **27**: 797-805.
- Dagan T, Artzy-Randrup Y & Martin W. 2008. Modular networks and cumulative impact of lateral transfer in prokaryote genome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 10039-10044.
- Dakora FD, Joseph CM & Phillips DA. 1993. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant physiology* **101**: 819-824.
- Davalos M, Fourment J, Lucas A, Berg s H & Kahn D. 2004. Nitrogen regulation in *Sinorhizobium meliloti* probed with whole genome arrays. *FEMS microbiology letters* **241**: 33-40.
- De-la-Pena C & Loyola-Vargas VM. 2014. Biotic interactions in the rhizosphere: a diverse cooperative enterprise for plant productivity. *Plant Physiol* **166**: 701-719.
- de Campos SB, Youn JW, Farina R, Jaenicke S, Junemann S, Szczepanowski R, Beneduzi A, Vargas LK, Goesmann A, Wendisch VF & Passaglia LM. 2013. Changes in root bacterial communities associated to two different development stages of canola (*Brassica napus* L. var *oleifera*) evaluated through next-generation sequencing technology. *Microb Ecol* **65**: 593-601.
- de las Nieves Peltzer M, Roques N, Poinso V, Aguilar OM, Batut J & Capela D. 2008. Auxotrophy accounts for nodulation defect of most *Sinorhizobium meliloti* mutants in the branched-chain amino acid biosynthesis pathway. *Molecular plant-microbe interactions* **21**: 1232-1241.
- de Lorenzo V, Herrero M, Jakubzik U & Timmis KN. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**: 6568-6572.
- De Nisco NJ, Abo RP, Wu CM, Penterman J & Walker GC. 2014. Global analysis of cell cycle gene expression of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**: 3217-3224.
- Denarie J, Debelle F & Rosenberg C. 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annu Rev Microbiol* **46**: 497-531.
- Dénarié J, Debelle F & Prom  J-C. 1996. Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual Review of Biochemistry* **65**: 503-535.
- Denison R & Kiers E. 2004. Lifestyle alternatives for rhizobia: mutualism, parasitism, and forgoing symbiosis. *FEMS microbiology letters* **237**: 187-193.
- Dickstein R, Scheirer DC, Fowle WH & Ausubel FM. 1991. Nodules elicited by *Rhizobium meliloti* heme mutants are arrested at an early stage of development. *Molecular and General Genetics MGG* **230**: 423-432.
- Ding H, Yip CB, Geddes BA, Oresnik IJ & Hynes MF. 2012. Glycerol utilization by *Rhizobium leguminosarum* requires an ABC transporter and affects competition for nodulation. *Microbiology* **158**: 1369-1378.
- Djordjevic MA. 2004. *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule: A proteomic perspective. *PROTEOMICS* **4**: 1859-1872.
- Djordjevic MA, Chen HC, Natera S, Van Noorden G, Menzel C, Taylor S, Renard C, Geiger O & Weiller GF. 2003. A global analysis of protein expression profiles in *Sinorhizobium meliloti*: discovery of new genes for nodule occupancy and stress adaptation. *Molecular plant-microbe interactions* **16**: 508-524.

- Dominguez-Ferreras A, Munoz S, Olivares J, Soto MJ & Sanjuan J. 2009. Role of potassium uptake systems in *Sinorhizobium meliloti* osmoadaptation and symbiotic performance. *J Bacteriol* **191**: 2133-2143.
- Dominguez-Ferreras A, Pérez-Arnedo R, Becker A, Olivares J, Soto MJ & Sanjuán J. 2006. Transcriptome profiling reveals the importance of plasmid pSymB for osmoadaptation of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* **188**: 7617-7625.
- Downie JA. 1998. Functions of rhizobial nodulation genes. *The Rhizobiaceae*, (Spaink H, Kondorosi A & Hooykaas PJ, ed. eds.), p. 387-402. Springer Netherlands.
- Downie JA. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiology Reviews* **34**: 150-170.
- Downie JA. 2014. Legume nodulation. *Current Biology* **24**: R184-R190.
- Draghi W. 2008. Estudios fisiológicos y ómicos de la respuesta de *Sinorhizobium meliloti* a la acidez extracelular. *Tesis Doctoral*.
- Draghi WO, Del Papa MF, Pistorio M, Lozano M, de Los Angeles Giusti M, Torres Tejerizo GA, Jofre E, Boiardi JL & Lagares A. 2010. Cultural conditions required for the induction of an adaptive acid-tolerance response (ATR) in *Sinorhizobium meliloti* and the question as to whether or not the ATR helps rhizobia improve their symbiosis with alfalfa at low pH. *FEMS Microbiol Lett* **302**: 123-130.
- Dunn MF. 2014. Key roles of microsymbiont amino acid metabolism in rhizobia-legume interactions. *Critical Reviews in Microbiology*.
- Eckert SE, Dziva F, Chaudhuri RR, Langridge GC, Turner DJ, Pickard DJ, Maskell DJ, Thomson NR & Stevens MP. 2011. Retrospective application of Transposon-Directed Insertion Site Sequencing to a library of Signature-Tagged Mini-Tn5Km2 mutants of *Escherichia coli* O157:H7 screened in cattle. *Journal of bacteriology* **193**: 1771-1776.
- Economou A, Davies AE, Johnston AWB & Downie JA. 1994. The *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* *nodO* gene can enable a *nodE* mutant of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* to nodulate vetch. *Microbiology* **140**: 2341-2347.
- el Zahar Haichar F, Santaella C, Heulin T & Achouak W. 2014. Root exudates mediated interactions belowground. *Soil Biology and Biochemistry* **77**: 69-80.
- Esseling JJ, Lhuissier FG & Emons AMC. 2003. Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant physiology* **132**: 1982-1988.
- Estrada-De Los Santos P, Bustillos-Cristales Ro & Caballero-Mellado J. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 2790-2798.
- Evans CGT, Herbert D & Tempest DW. 1970. Chapter XIII. The continuous cultivation of Microorganisms. **2**: 277-327.
- Fåhræus G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *Journal of General Microbiology* **16**: 374-381.
- Fauvart M & Michiels J. 2008. Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the rhizobium-legume symbiosis. *FEMS microbiology letters* **285**: 1-9.
- Ferguson GP, Roop li RM & Walker GC. 2002. Deficiency of a *Sinorhizobium meliloti* *bacA* mutant in alfalfa symbiosis correlates with alteration of the cell envelope. *Journal of bacteriology* **184**: 5625-5632.

- Ferguson GP, Datta A, Baumgartner J, Roop RM, Carlson RW & Walker GC. 2004. Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* BacA affect lipid-A fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 5012-5017.
- Finan TM, Hartweig E, LeMieux K, Bergman K, Walker GC & Signer ER. 1984. General transduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **159**: 120-124.
- Fischer H-M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological Reviews* **58**: 352.
- Fowler D, Coyle M, Skiba U, Sutton MA, Cape JN, Reis S, Sheppard LJ, Jenkins A, Grizzetti B, Galloway JN, Vitousek P, Leach A, Bouwman AF, Butterbach-Bahl K, Dentener F, Stevenson D, Amann M & Voss M. 2013. The global nitrogen cycle in the twenty-first century.
- Frayse N, Couderc F & Poinso V. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry* **270**: 1365-1380.
- Fry J, Wood M & Poole PS. 2001. Investigation of myo-inositol catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* and its effect on nodulation competitiveness. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 1016-1025.
- Gage DJ. 2002. Analysis of infection thread development using Gfp- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* **184**: 7042-7046.
- Gage DJ. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**: 280-300.
- Galardini M, Mengoni A, Brilli M, Pini F, Fioravanti A, Lucas S, Lapidus A, Cheng J-F, Goodwin L & Pitluck S. 2011. Exploring the symbiotic pangenome of the nitrogen-fixing bacterium *Sinorhizobium meliloti*. *BMC genomics* **12**: 235.
- Galibert F, Finan TM, Long SR, Puhler A, Abola P, Ampe F, Barloy-Hubler F, Barnett MJ, Becker A, Boistard P, Bothe G, Boutry M, Bowser L, Buhrmester J, Cadieu E, Capela D, Chain P, Cowie A, Davis RW, Dreano S, Federspiel NA, Fisher RF, Gloux S, Godrie T, Goffeau A, Golding B, Gouzy J, Gurjal M, Hernandez-Lucas I, Hong A, Huizar L, Hyman RW, Jones T, Kahn D, Kahn ML, Kalman S, Keating DH, Kiss E, Komp C, Lelaure V, Masuy D, Palm C, Peck MC, Pohl TM, Portetelle D, Purnelle B, Ramsperger U, Surzycki R, Thebault P, Vandenbol M, Vorholter FJ, Weidner S, Wells DH, Wong K, Yeh KC & Batut J. 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**: 668-672.
- Galperin MY & Koonin EV. 2010. From complete genome sequence to 'complete' understanding? *Trends in Biotechnology* **28**: 398-406.
- Gao M & Teplitski M. 2008. RIVET-a tool for in vivo analysis of symbiotically relevant gene expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Molecular plant-microbe interactions* **21**: 162-170.
- Gao S, Romdhane SB, Beullens S, Kaever V, Lambrichts I, Fauvart M & Michiels J. 2014. Genomic analysis of cyclic-di-GMP-related genes in rhizobial type strains and functional analysis in *Rhizobium etli*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 4589-4602.
- Garrido ME, Bosch M, Medina R, Llagostera M, Pérez de Rozas AM, Badiola I & Barbé J. 2003. The high affinity zinc uptake system *znuACB* is under control of the iron uptake regulator (*fur*) gene in the animal pathogen *Pasteurella multocida*. *FEMS microbiology letters* **221**: 31-37.
- Gawronski JD, Wong SMS, Giannoukos G, Ward DV & Akerley BJ. 2009. Tracking insertion mutants within libraries by deep sequencing and a genome-wide screen for *Haemophilus* genes required in the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 16422-16427.

- Gepts P, Beavis WD, Brummer EC, Shoemaker RC, Stalker HT, Weeden NF & Young ND. 2005. Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant physiology* **137**: 1228-1235.
- Gibson KE, Kobayashi H & Walker GC. 2008. Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annual Review of Genetics* **42**: 413-441.
- Glazebrook J, Ichige A & Walker G. 1993. A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes & Development* **7**: 1485-1497.
- Goodman AL, McNulty NP, Zhao Y, Leip D, Mitra RD, Lozupone CA, Knight R & Gordon JI. 2009. Identifying genetic determinants needed to establish a human gut symbiont in its habitat. *Cell Host & Microbe* **6**: 279-289.
- Graham PH & Vance CP. 2003. Legumes: importance and constraints to greater use. *Plant physiology* **131**: 872-877.
- Groh JL, Luo Q, Ballard JD & Krumholz LR. 2005. A method adapting microarray technology for signature-tagged mutagenesis of *Desulfovibrio desulfuricans* G20 and *Shewanella oneidensis* MR-1 in anaerobic sediment survival experiments. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7064-7074.
- Halbleib CM & Ludden PW. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of nutrition* **130**: 1081-1084.
- Harrison CL, Crook MB, Peco G, Long SR & Griffiths JS. 2011. Employing site-specific recombination for conditional genetic analysis in *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* **77**: 3916-3922.
- Hava DL & Camilli A. 2002. Large-scale identification of serotype 4 *Streptococcus pneumoniae* virulence factors. *Molecular microbiology* **45**: 1389-1406.
- Hellweg C, Puhler A & Weidner S. 2009. The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiol* **9**: 37.
- Hensel M, Shea J, Gleeson C, Jones M, Dalton E & Holden D. 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science* **269**: 400-403.
- Hillel D. 1971. *Soil and water*. Elsevier.
- Hubber A, Vergunst AC, Sullivan JT, Hooykaas PJJ & Ronson CW. 2004. Symbiotic phenotypes and translocated effector proteins of the *Mesorhizobium loti* strain R7A VirB/D4 type IV secretion system. *Molecular microbiology* **54**: 561-574.
- Ichige A & Walker GC. 1997. Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *bacA* gene: functional interchangeability with the *Escherichia coli* *sbmA* gene and phenotypes of mutants. *Journal of bacteriology* **179**: 209-216.
- Janczarek M, Rachwał K, Marzec A, Grządziel J & Palusińska-Szys M. 2014. Signal molecules and cell-surface components involved in early stages of the legume-rhizobium interactions. *Applied Soil Ecology* **85**: 94-113.
- Jiang G, Krishnan AH, Kim YW, Wacek TJ & Krishnan HB. 2001. A functional myo-inositol dehydrogenase gene is required for efficient nitrogen fixation and competitiveness of *Sinorhizobium fredii* USDA191 to nodulate soybean (*Glycine max* [L.] Merr.). *J Bacteriol* **183**: 2595-2604.

- Jiménez-Zurdo JI, Garcia-Rodriguez FM & Toro N. 1997. The *Rhizobium meliloti* *putA* gene: its role in the establishment of the symbiotic interaction with alfalfa. *Mol Microbiol* **23**: 85-93.
- Jiménez-Zurdo JI, Van Dillewijn P, Soto MJ, De Felipe MR, Olivares J & Toro N. 1995. Characterization of a *Rhizobium meliloti* proline dehydrogenase mutant altered in nodulation efficiency and competitiveness on alfalfa roots. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions* **8**: 492-498.
- Jones AL, Knoll KM & Rubens CE. 2000. Identification of *Streptococcus agalactiae* virulence genes in the neonatal rat sepsis model using signature-tagged mutagenesis. *Molecular microbiology* **37**: 1444-1455.
- Jones DL, Nguyen C & Finlay RD. 2009. Carbon flow in the rhizosphere: carbon trading at the soil-root interface. *Plant and Soil* **321**: 5-33.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME & Walker GC. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nature Reviews Microbiology* **5**: 619-633.
- Jones KM, Sharopova N, Lohar DP, Zhang JQ, VandenBosch KA & Walker GC. 2008. Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 704-709.
- Juszczuk IM, Wiktorowska A, Malusá E & Rychter AM. 2004. Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant and Soil* **267**: 41-49.
- Karlyshev AV, Oyston PCF, Williams K, Clark GC, Titball RW, Winzeler EA & Wren BW. 2001. Application of high-density array-based signature-tagged mutagenesis to discover novel *Yersinia* virulence-associated genes. *Infection and Immunity* **69**: 7810-7819.
- Karunakaran R, Ramachandran VK, Seaman JC, East AK, Mouhsine B, Mauchline TH, Prell J, Skeffington A & Poole PS. 2009. Transcriptomic analysis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* in symbiosis with host plants *Pisum sativum* and *Vicia cracca*. *Journal of bacteriology* **191**: 4002-4014.
- Karunakaran R, Haag AF, East AK, Ramachandran VK, Prell J, James EK, Scocchi M, Ferguson GP & Poole PS. 2010. *BacA* is essential for bacteroid development in nodules of galeoid, but not phaseoloid, legumes. *Journal of bacteriology* **192**: 2920-2928.
- Kavermann H, Burns BP, Angermüller K, Odenbreit S, Fischer W, Melchers K & Haas R. 2003. Identification and characterization of *Helicobacter pylori* genes essential for gastric colonization. *The Journal of experimental medicine* **197**: 813-822.
- Kim J & Rees DC. 1994. Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochemistry* **33**: 389-397.
- Koch M, Delmotte N, Ahrens CH, Omasits U, Schneider K, Danza F, Padhi B, Murset V, Braissant O, Vorholt JA, Hennecke H & Pessi G. 2014. A link between arabinose utilization and oxalotrophy in *Bradyrhizobium japonicum*. *Appl Environ Microbiol* **80**: 2094-2101.
- Kondorosi E, Mergaert P & Kereszt A. 2013. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annual Review of Microbiology* **67**: 611-628.
- Krol E & Becker A. 2004. Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Molecular Genetics and Genomics* **272**: 1-17.

- Kroos L & Kaiser D. 1984. Construction of Tn5 *lac*, a transposon that fuses *lacZ* expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 5816-5820.
- Kroupitski Y, Brandl MT, Pinto R, Belausov E, Tamir-Ariel D, Burdman S & Sela S. 2013. Identification of *Salmonella enterica* genes with a role in persistence on lettuce leaves during cold storage by Recombinase-based In Vivo Expression Technology. *Phytopathology* **103**: 362-372.
- Lagares A, Caetano-Anolles G, Niehaus K, Lorenzen J, Ljunggren H, Pühler A & Favelukes G. 1992. A *Rhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant altered in competitiveness for nodulation of alfalfa. *Journal of bacteriology* **174**: 5941-5952.
- Lamrabet Y, Bellogin RA, Cubo T, Espuny R, Gil A, Krishnan HB, Megias M, Ollero FJ, Pueppke SG, Ruiz-Sainz JE, Spaink HP, Tejero-Mateo P, Thomas-Oates J & Vinardell JM. 1999. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 207-217.
- Langridge GC, Phan MD, Turner DJ, Perkins TT, Parts L, Haase J, Charles I, Maskell DJ, Peters SE, Dougan G, Wain J, Parkhill J & Turner AK. 2009. Simultaneous assay of every *Salmonella Typhi* gene using one million transposon mutants. *Genome Research* **19**: 2308-2316.
- Lefebvre B, Timmers T, Mbengue M, Moreau S, Hervé C, Tóth K, Bittencourt-Silvestre J, Klaus D, Deslandes L & Godiard L. 2010. A remorin protein interacts with symbiotic receptors and regulates bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 2343-2348.
- Lehoux DE & Levesque RC. 2002. Polymerase chain reaction-based signature-tagged mutagenesis. In *In Vitro Mutagenesis Protocols*, ed. ^eds.), p. ^pp. 127-137. Springer.
- Leigh S, Forman S, Perry R & Straley S. 2005. Unexpected results from the application of signature-tagged mutagenesis to identify *Yersinia pestis* genes required for adherence and invasion. *Microbial pathogenesis* **38**: 259-266.
- Lewis DA, Klesney-Tait J, Lumbley SR, Ward CK, Latimer JL, Ison CA & Hansen EJ. 1999. Identification of the *znuA*-encoded periplasmic zinc transport protein of *Haemophilus ducreyi*. *Infection and Immunity* **67**: 5060-5068.
- Lin Tung W & Chow K-C. 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends in Genetics* **11**: 128-129.
- Long SR. 2001. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant physiology* **125**: 69-72.
- Long SR & Staskawicz BJ. 1993. Prokaryotic plant parasites. *Cell* **73**: 921-935.
- López JC, Grasso DH, Frugier F, Crespi MD & Aguilar OM. 2001. Early symbiotic responses induced by *Sinorhizobium meliloti ilvC* mutants in alfalfa. *Molecular plant-microbe interactions* **14**: 55-62.
- Lowe AM, Beattie DT & Deresiewicz RL. 1998. Identification of novel staphylococcal virulence genes by in vivo expression technology. *Molecular microbiology* **27**: 967-976.
- Lozano M, Salas M, Giusti M, Draghi W, Torres Tejerizo G, Martini M, Del Papa M, Pistorio M & Lagares A. 2011. Development of new positive-selection RIVET tools: Detection of induced promoters by the excision-based transcriptional activation of an *aacCI*-Gm^R-gfp fusion. *Journal of biotechnology* **155**: 147-155.
- Lozano MJ. 2010. Desarrollo, construcción y validación de sistemas RIVET para la identificación de genes de rizobios inducidos durante condiciones específicas de vida libre, o la simbiosis. *Tesis Doctoral*.

- Lozano MJ, Salas ME, Giusti MdlÁ, Martini MC, López JL, Salto I, Del Papa MF, Pistorio M & Lagares A. 2013a. Novel tnpR-based transposable promoter traps suitable for RIVET studies in different gram-negative bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **93**: 9-11.
- Lozano MJ, Salas ME, Luís LJ, Javier AF, Florencia DPM, Mariano P & Antonio L. 2013b. Aplicación de la tecnología RIVET (Recombination-based In Vivo Expression Technology) a la caracterización molecular de la interacción simbiótica *Sinorhizobium meliloti* – *Medicago spp.* *Microbiología Agrícola. Un aporte de la investigación en Argentina- Segunda Edición.*
- MacLean AM, Finan TM & Sadowsky MJ. 2007. Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant physiology* **144**: 615-622.
- Mahan MJ, Slauch JM & Mekalanos JJ. 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science* **259**: 686-686.
- Marguerat S & Bähler J. 2010. RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and molecular life sciences* **67**: 569-579.
- Marie C, Deakin WJ, Viprey V, Kopcińska J, Golinowski W, Krishnan HB, Perret X & Broughton WJ. 2003. Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Molecular plant-microbe interactions* **16**: 743-751.
- Marshall TJ, Holmes JW & Rose CW. 1996. *Soil physics*. Cambridge University Press.
- Martínez-García E, Calles B, Arévalo-Rodríguez M & de Lorenzo V. 2011. pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiology* **11**: 38.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X & Batut J. 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? *Trends in Microbiology* **17**: 458-466.
- Mathesius U, Keijzers G, Natera SH, Weinman JJ, Djordjevic MA & Rolfe BG. 2001. Establishment of a root proteome reference map for the model legume *Medicago truncatula* using the expressed sequence tag database for peptide mass fingerprinting. *Proteomics* **1**: 1424-1440.
- Mathesius U, Imin N, Chen H, Djordjevic MA, Weinman JJ, Natera SH, Morris AC, Kerim T, Paul S, Menzel C, Weiller GF & Rolfe BG. 2002. Evaluation of proteome reference maps for cross-species identification of proteins by peptide mass fingerprinting. *Proteomics* **2**: 1288-1303.
- Mauchline TH, Fowler JE, East AK, Sartor AL, Zaheer R, Hosie AHF, Poole PS & Finan TM. 2006. Mapping the *Sinorhizobium meliloti* 1021 solute-binding protein-dependent transportome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 17933-17938.
- McNear Jr D. 2013. The rhizosphere—roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge* **4**.
- Meier VM, Muschler P & Scharf BE. 2006. Functional analysis of nine putative chemoreceptor proteins in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* **189**: 1816-1826.
- Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, Mausset AE, Barloy-Hubler F, Galibert F, Kondorosi A & Kondorosi E. 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**: 5230-5235.
- Merighi M, Ellermeier CD, Slauch JM & Gunn JS. 2005. Resolvase-in vivo expression technology analysis of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* PhoP and PmrA regulons in BALB/c mice. *Journal of bacteriology* **187**: 7407-7416.

- Michiels J, Dombrecht B, Vermeiren N, Xi C, Luyten E & Vanderleyden J. 1998. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiology Ecology* **26**: 193-205.
- Milner JL, Araujo RS & Handelsman J. 1992. Molecular and symbiotic characterization of exopolysaccharide deficient mutants of *Rhizobium tropici* strain CIAT899. *Molecular microbiology* **6**: 3137-3147.
- Moe LA. 2013. Amino acids in the rhizosphere: From plants to microbes. *American Journal of Botany* **100**: 1692-1705.
- Moreau S, Verdenaud M, Ott T, Letort S, de Billy F, Niebel A, Gouzy J, de Carvalho-Niebel F & Gamas P. 2011. Transcription reprogramming during root nodule development in *Medicago truncatula*. *PLoS one* **6**: e16463.
- Morieri G, Martinez EA, Jarynowski A, Driguez H, Morris R, Oldroyd GE & Downie JA. 2013. Host specific Nod factors associated with *Medicago truncatula* nodule infection differentially induce calcium influx and calcium spiking in root hairs. *New Phytologist* **200**: 656-662.
- Mortier V, Holsters M & Goormachtig S. 2012. Never too many? How legumes control nodule numbers. *Plant, Cell & Environment* **35**: 245-258.
- Munoz Aguilar JM, Ashby AM, Richards AJM, Loake GJ, Watson MD & Shaw CH. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. *Journal of General Microbiology* **134**: 2741-2746.
- Nagata Y, Senbongi J, Ishibashi Y, Sudo R, Miyakoshi M, Ohtsubo Y & Tsuda M. 2014. Identification of *Burkholderia multivorans* ATCC 17616 genetic determinants for fitness in soil by using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **160**: 883-891.
- Nguyen C. 2003. Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls. *Agronomie* **23**: 375-396.
- Nicola P, Liuni S, Attimonelli M & Pasole G. 1993. FASTPAT: a fast and efficient algorithm for string searching in DNA sequences. *Computer applications in the biosciences: CABIOS* **9**: 541-545.
- Niehaus K, Lagares A & Pühler A. 1998. A *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharide mutant induces effective nodules on the host plant *Medicago sativa* (alfalfa) but fails to establish a symbiosis with *Medicago truncatula*. *Molecular plant-microbe interactions* **11**: 906-914.
- Noel JT, Arrach N, Alagely A, McClelland M & Teplitski M. 2010. Specific responses of *Salmonella enterica* to tomato varieties and fruit ripeness identified by in vivo expression technology. *PLoS one* **5**: e12406.
- Oke V & Long SR. 1999. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Molecular microbiology* **32**: 837-849.
- Oldroyd GE & Dixon R. 2014. Biotechnological solutions to the nitrogen problem. *Current opinion in biotechnology* **26**: 19-24.
- Oldroyd GE, Engstrom EM & Long SR. 2001. Ethylene inhibits the Nod factor signal transduction pathway of *Medicago truncatula*. *The Plant Cell Online* **13**: 1835-1849.
- Oldroyd GED. 2013. Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 252-263.
- Oldroyd GED & Downie JA. 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 566-576.

- Oldroyd GED & Downie JA. 2008. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual Review of Plant Biology* 59: 519-546.
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS & Downie JA. 2011. The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis. *Annual Review of Genetics* 45: 119-144.
- Olivares J, Bedmar EJ & Sanjuán J. 2013. Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular plant-microbe interactions* 26: 486-494.
- Osbourn A, Barber C & Daniels M. 1987. Identification of plant-induced genes of the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* pathovar *campestris* using a promoter-probe plasmid. *The EMBO journal* 6: 23.
- Osorio CG, Crawford JA, Michalski J, Martinez-Wilson H, Kaper JB & Camilli A. 2005. Second-Generation recombination-based in vivo expression technology for large-scale screening for *Vibrio cholerae* genes induced during infection of the mouse small intestine. *Infection and Immunity* 73: 972-980.
- Ott T, van Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P & Udvardi MK. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current Biology* 15: 531-535.
- Parada M, Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo Á, Gutiérrez R, Buendía-Clavería AM, Lei W, Margaret I, López-Baena FJ & Gil-Serrano AM. 2006. *Sinorhizobium fredii* HH103 mutants affected in capsular polysaccharide (KPS) are impaired for nodulation with soybean and *Cajanus cajan*. *Molecular plant-microbe interactions* 19: 43-52.
- 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.
- Pellock BJ, Cheng H-P & Walker GC. 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *Journal of bacteriology* 182: 4310-4318.
- Penmetsa RV & Cook DR. 1997. A legume ethylene-insensitive mutant hyperinfected by its rhizobial symbiont. *Science* 275: 527-530.
- Penmetsa RV, Frugoli JA, Smith LS, Long SR & Cook DR. 2003. Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant physiology* 131: 998-1008.
- Penterman J, Abo RP, De Nisco NJ, Arnold MFF, Longhi R, Zanda M & Walker GC. 2014. Host plant peptides elicit a transcriptional response to control the *Sinorhizobium meliloti* cell cycle during symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 3561-3566.
- Perret X, Staehelin C & Broughton WJ. 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 180-201.
- Perret X, Freiberg C, Rosenthal A, Broughton WJ & Fellay R. 1999. High resolution transcriptional analysis of the symbiotic plasmid of *Rhizobium* sp. NGR234. *Molecular microbiology* 32: 415-425.
- Philippot L, Raaijmakers JM, Lemanceau P & van der Putten WH. 2013. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nature Reviews Microbiology* 11: 789-799.
- Pinton R, Varanini Z & Nannipieri P. 2001. The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants, and microorganisms.
- Pistorio M, Balagué L, Papa M, Pich-Otero A, Lodeiro A, Hozbor D & Lagares A. 2002. Construction of a *Sinorhizobium meliloti* strain carrying a stable and non transmissible chromosomal single copy of the green fluorescent protein GFP P64L/S65T. *FEMS microbiology letters* 214: 165-170.

- Pobigaylo N. 2006. Identification of genes in *Sinorhizobium meliloti* relevant to symbiosis and competitiveness using signature tagged transposons. *Doctoral Thesis, Bielefeld University*.
- Pobigaylo N, Szymczak S, Nattkemper TW & Becker A. 2008. Identification of genes relevant to symbiosis and competitiveness in *Sinorhizobium meliloti* using signature-tagged mutants. *Molecular plant-microbe interactions* **21**: 219-231.
- Pobigaylo N, Wetter D, Szymczak S, Schiller U, Kurtz S, Meyer F, Nattkemper TW & Becker A. 2006. Construction of a large signature-tagged mini-Tn5 transposon library and its application to mutagenesis of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 4329-4337.
- Poole P & Allaway D. 2000. Carbon and nitrogen metabolism in Rhizobium. *Advances in Microbial Physiology*, Vol. Volume 43 ed.^eds.), p. 117-163. Academic Press.
- Prashar P, Kapoor N & Sachdeva S. 2013. Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* **13**: 63-77.
- Prell J & Poole P. 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends in Microbiology* **14**: 161-168.
- Prell J, White J, Bourdes A, Bunnewell S, Bongaerts R & Poole P. 2009. Legumes regulate *Rhizobium* bacteroid development and persistence by the supply of branched-chain amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 12477-12482.
- Pueppke SG & Broughton WJ. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular plant-microbe interactions* **12**: 293-318.
- Radutoiu S, Madsen LH, Madsen EB, Felle HH, Umehara Y, Grønlund M, Sato S, Nakamura Y, Tabata S & Sandal N. 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**: 585-592.
- Ramachandran VK, East AK, Karunakaran R, Downie JA & Poole PS. 2011. Adaptation of *Rhizobium leguminosarum* to pea, alfalfa and sugar beet rhizospheres investigated by comparative transcriptomics. *Genome Biol* **12**: R106.
- Rappleye C. 2004. Silica Clean-up of DNA. Aroian Lab Protocols, University of California, San Diego.
- Rees DC & Howard JB. 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr Opin Chem Biol* **4**: 559-566.
- Reeve WG, Tiwari RP, Worsley PS, Dilworth MJ, Glenn AR & Howieson JG. 1999. Constructs for insertional mutagenesis, transcriptional signal localization and gene regulation studies in root nodule and other bacteria. *Microbiology* **145**: 1307-1316.
- Reis VM. 2004. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**: 2155-2162.
- Robleto EA, Kmiecik K, Oplinger ES, Nienhuis J & Triplett EW. 1998. Trifolixin production increases nodulation competitiveness of *Rhizobium etli* CE3 under agricultural conditions. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2630-2633.
- Roche P, Debelle F, Maillet F, Lerouge P, Faucher C, Truchet G, Dénarié J & Promé J-C. 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-Navarro DN, Dardanelli MS & Ruíz-Saíenz JE. 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS microbiology letters* **272**: 127-136.

- Rovira A. 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annual Reviews in Microbiology* 19: 241-266.
- Ruberg S, Tian ZX, Krol E, Linke B, Meyer F, Wang Y, Puhler A, Weidner S & Becker A. 2003. Construction and validation of a *Sinorhizobium meliloti* whole genome DNA microarray: genome-wide profiling of osmoadaptive gene expression. *J Biotechnol* 106: 255-268.
- Sallet E, Roux B, Sauviac L, Carrère S, Faraut T, de Carvalho-Niebel F, Gouzy J, Gamas P, Capela D & Bruand C. 2013. Next-generation annotation of prokaryotic genomes with EuGene-P: application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA Research* 20: 339-354.
- Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. In C. S. H. L. Press (ed.). Cold Spring Harbor, NY, U.S.A.
- Sanchez C, Iannino F, Deakin WJ, Ugalde RA & Lepek VC. 2009. Characterization of the *Mesorhizobium loti* MAFF303099 type-three protein secretion system. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 519-528.
- Sanjuán-Pinilla JM, Muñoz S, Nogales J, Olivares J & Sanjuán J. 2002. Involvement of the *Sinorhizobium meliloti* *leuA* gene in activation of nodulation genes by NodD1 and luteolin. *Archives of Microbiology* 178: 36-44.
- Saviola B, Woolwine SC & Bishai WR. 2003. Isolation of acid-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis* with the use of recombinase-based in vivo expression technology. *Infection and Immunity* 71: 1379-1388.
- Savka MA, Dessaux Y, Oger P & Rossbach S. 2002. Engineering bacterial competitiveness and persistence in the phytosphere. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 866-874.
- Scharf B & Schmitt R. 2002. Sensory transduction to the flagellar motor of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 4: 183-186.
- Schlüter J-P, Reinkensmeier J, Barnett MJ, Lang C, Krol E, Giegerich R, Long SR & Becker A. 2013. Global mapping of transcription start sites and promoter motifs in the symbiotic α -proteobacterium *Sinorhizobium meliloti* 1021. *BMC genomics* 14: 156.
- Schlüter J-P, Reinkensmeier J, Daschkey S, Evguenieva-Hackenberg E, Janssen S, Jänicke S, Becker JD, Giegerich R & Becker A. 2010. A genome-wide survey of sRNAs in the symbiotic nitrogen-fixing alpha-proteobacterium *Sinorhizobium meliloti*. *BMC genomics* 11: 245.
- Schwan WR, Coulter SN, Ng EYW, Langhorne MH, Ritchie HD, Brody LL, Westbrook-Wadman S, Bayer AS, Folger KR & Stover CK. 1998. Identification and characterization of the PutP proline permease that contributes to in vivo survival of *Staphylococcus aureus* in animal models. *Infection and Immunity* 66: 567-572.
- Selbitschka W, Arnold W, Priefer U, Rottschäfer T, Schmidt M, Simon R & Pühler A. 1991. Characterization of *recA* genes and *recA* mutants of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Molecular and General Genetics MGG* 229: 86-95.
- Selbitschka W, Jording D, Nieman S, Schmidt R, Pühler A, Mendum T & Hirsch P. 1995. Construction and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* strain designed to assess horizontal gene transfer in the environment. *FEMS microbiology letters* 128: 255-263.
- Shimoda Y, Mitsui H, Kamimatsuse H, Minamisawa K, Nishiyama E, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M, Shinpo S, Watanabe A, Kohara M, Yamada M, Nakamura Y, Tabata S & Sato S. 2008. Construction of signature-tagged mutant library in *Mesorhizobium loti* as a powerful tool for functional genomics. *DNA Research* 15: 297-308.

- Simon R, Priefer U & Pühler A. 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature Biotechnology* 1: 784-791.
- Simon R, Quandt J & Klipp W. 1989. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* 80: 161-169.
- Sourjik V & Schmitt R. 1996. Different roles of CheY1 and CheY2 in the chemotaxis of *Rhizobium meliloti*. *Molecular microbiology* 22: 427-436.
- Sourjik V, Sterr W, Platzer J, Bos I, Haslbeck M & Schmitt R. 1998. Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* 223: 283-290.
- Spaink HP. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* 54: 257-288.
- Spaink HP, Wijffes AH & Lugtenberg BJ. 1995. Rhizobium NodI and NodJ proteins play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligosaccharides. *Journal of bacteriology* 177: 6276-6281.
- Spaink HP, Sheeley DM, van Brussel AA, Glushka J, York WS, Tak T, Geiger O, Kennedy EP, Reinhold VN & Lugtenberg BJ. 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*.
- Stark WM, Grindley N, Hatfull GF & Boocock MR. 1991. Resolvase-catalysed reactions between res sites differing in the central dinucleotide of subsite I. *The EMBO journal* 10: 3541.
- Stougaard J. 2001. Genetics and genomics of root symbiosis. *Curr Opin Plant Biol* 4: 328-335.
- Streeter J & Wong PP. 1988. Inhibition of legume nodule formation and N₂ fixation by nitrate. *Critical Reviews in Plant Sciences* 7: 1-23.
- Sullivan JT & Ronson CW. 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5145-5149.
- Sullivan JT, Eardly BD, van Berkum P & Ronson CW. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. *Appl Environ Microbiol* 62: 2818-2825.
- Sullivan JT, Patrick HN, Lowther WL, Scott DB & Ronson CW. 1995. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 8985-8989.
- Terpolilli JJ, Hood GA & Poole PS. 2012. What Determines the Efficiency of N₂-Fixing *Rhizobium*-Legume Symbioses? 60: 325-389.
- Tiricz H, Szűcs A, Farkas A, Pap B, Lima RM, Maróti G, Kondorosi É & Kereszt A. 2013. Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides induce membrane depolarization associated changes in the transcriptome of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Torres-Quesada O, Reinkensmeier J, Schlüter J-P, Robledo M, Peregrina A, Giegerich R, Toro N, Becker A & Jiménez-Zurdo JI. 2014. Genome-wide profiling of Hfq-binding RNAs uncovers extensive post-transcriptional rewiring of major stress response and symbiotic regulons in *Sinorhizobium meliloti*. *RNA Biology* 11: 563-579.
- Trinick M & Galbraith J. 1980. The *Rhizobium* requirements of the non-legume *Parasponia* in relationship to the cross-inoculation group concept of legumes. *New Phytologist* 86: 17-26.

- Triplett EW. 1988. Isolation of genes involved in nodulation competitiveness from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* T24. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3810-3814.
- Triplett EW. 1990. Construction of a symbiotically effective strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* with increased nodulation competitiveness. *Appl Environ Microbiol* **56**: 98-103.
- Triplett EW & Barta TM. 1987. Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* Strain T24 on clover. *Plant Physiol* **85**: 335-342.
- Triplett EW & Sadowsky MJ. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu Rev Microbiol* **46**: 399-428.
- Turner TR, James EK & Poole PS. 2013. The plant microbiome. *Genome Biol* **14**.
- Turner TR, Ramakrishnan K, Walshaw J, Heavens D, Alston M, Swarbreck D, Osbourn A, Grant A & Poole PS. 2013. Comparative metatranscriptomics reveals kingdom level changes in the rhizosphere microbiome of plants. *ISME J* **7**: 2248-2258.
- Udvardi M & Poole PS. 2013. Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 781-805.
- Udvardi MK & Day DA. 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annual Review of Plant Biology* **48**: 493-523.
- Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moenne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dye F & Prigent-Combaret C. 2013. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. *Front Plant Sci* **4**: 356.
- Vahling-Armstrong CM, Zhou H, Benyon L, Morgan JK & Duan Y. 2012. Two plant bacteria, *S. meliloti* and *Ca. Liberibacter asiaticus*, share functional *znuABC* homologues that encode for a high affinity zinc uptake system. *PLoS one* **7**: e37340.
- Van de Velde W, Zehirov G, Szatmari A, Debreczeny M, Ishihara H, Kevei Z, Farkas A, Mikulass K, Nagy A, Tiricz H, Satiat-Jeunemaitre B, Alunni B, Bourge M, Kucho Ki, Abe M, Kereszt A, Maroti G, Uchiumi T, Kondorosi E & Mergaert P. 2010. Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science* **327**: 1122-1126.
- Van Dillewijn P, Soto MJ, Villadas PJ & Toro N. 2001. Construction and environmental release of a *Sinorhizobium meliloti* strain genetically modified to be more competitive for alfalfa nodulation. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3860-3865.
- Van Loosdrecht M, Lyklema J, Norde W & Zehnder A. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews* **54**: 75-87.
- Van Opijnen T & Camilli A. 2013. Transposon insertion sequencing: a new tool for systems-level analysis of microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* **11**: 435-442.
- Van Opijnen T, Bodi KL & Camilli A. 2009. Tn-seq: high-throughput parallel sequencing for fitness and genetic interaction studies in microorganisms. *Nature methods* **6**: 767-772.
- Van Rhijn P & Vanderleyden J. 1995. The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol Rev* **59**: 124-142.
- Vance CP. 2001. Symbiotic nitrogen fixation and phosphorus acquisition. Plant nutrition in a world of declining renewable resources. *Plant physiology* **127**: 390-397.
- Vasse J, de Billy F & Truchet G. 1993. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*—alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *The Plant Journal* **4**: 555-566.
- Vessey JK. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**: 571-586.

- Vineetha K, Vij N, Prasad CK, Hassani R & Randhawa GS. 2001. Ultrastructural studies on nodules induced by pyrimidine auxotrophs of *Sinorhizobium meliloti*. *Indian journal of experimental biology* 39: 371-377.
- Vlassak K, Luyten E, Verreth C, Van Rhijn P, Bisseling T & Vanderleyden J. 1998. The *Rhizobium* sp. BR816 *nodO* gene can function as a determinant for nodulation of *Leucaena leucocephala*, *Phaseolus vulgaris*, and *Trifolium repens* by a diversity of *Rhizobium* spp. *Molecular plant-microbe interactions* 11: 383-392.
- Vriezen JA, De Bruijn FJ & Nüsslein K. 2007. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen, and temperature. *Applied and Environmental Microbiology* 73: 3451-3459.
- Wagner SC. 2011. Biological nitrogen fixation. *Nat. Educ. Knowl* 2: 14.
- Wall LG & Favelukes G. 1991. Early recognition in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis: root exudate factor stimulates root adsorption of homologous rhizobia. *J Bacteriol* 173: 3492-3499.
- Wang D, Yang S, Tang F & Zhu H. 2012. Symbiosis specificity in the legume-rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology* 14: 334-342.
- Wang J, Mushegian A, Lory S & Jin S. 1996. Large-scale isolation of candidate virulence genes of *Pseudomonas aeruginosa* by in vivo selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93: 10434-10439.
- Wang L-X, Wang Y, Pellock B & Walker GC. 1999. Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of bacteriology* 181: 6788-6796.
- Weidner S, Puhler A & Kuster H. 2003. Genomics insights into symbiotic nitrogen fixation. *Curr Opin Biotechnol* 14: 200-205.
- Weir BS. 2012. The current taxonomy of rhizobia. *NZ Rhizobia website*. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>
- Wilson KJ, Sessitsch A, Corbo JC, Giller KE, Akkermans ADL & Jefferson RA. 1995. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* 141: 1691-1705.
- Williams A, Wilkinson A, Krehenbrink M, Russo DM, Zorreguieta A & Downie JA. 2008. Glucomannan-mediated attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hairs is required for competitive nodule infection. *Journal of bacteriology* 190: 4706-4715.
- Wojciechowski MF, Lavin M & Sanderson MJ. 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany* 91: 1846-1862.
- Yang X, Becker T, Walters N & Pascual DW. 2006. Deletion of *znuA* virulence factor attenuates *Brucella abortus* and confers protection against wild-type challenge. *Infection and Immunity* 74: 3874-3879.
- Zhang XS & Cheng HP. 2006. Identification of *Sinorhizobium meliloti* early symbiotic genes by use of a positive functional screen. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 2738-2748.
- Zhang Y, Ruyter-Spira C & Bouwmeester HJ. 2015. Engineering the plant rhizosphere. *Current opinion in biotechnology* 32: 136-142.

