



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS

**PROCESOS ECO-EVOLUTIVOS DIRIGEN EL SURGIMIENTO Y DINÁMICA DE LAS
INTERACCIONES INTERESPECÍFICAS**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANDRÉS ANDRADE DOMÍNGUEZ

TUTOR:

DR. SERGIO MANUEL ENCARNACIÓN GUEVARA
CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. JORGE NIETO SOTELO, INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM.
DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

MÉXICO, CUERNAVACA, MARZO DEL 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada a mi hijo, mi esposa y mis padres.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Dr. Sergio Encarnación, por haber guiado y apoyado mi investigación, y haberme dado la oportunidad de desarrollar mis ideas. También agradezco a los miembros de mi comité tutor, Dr. Jorge Nieto, Dr. Guillermo Gosset por sus críticas y sugerencias que enriquecieron mi investigación. Agradezco a la Dra. Esperanza Martínez, Dra. Valeria Souza, Dr. Otto Geiger y al Dr. Enrique Morett porque sus observaciones y sugerencias, ayudaron a mejorar esta tesis. Agradezco a mis amigos del laboratorio por sus opiniones y su apoyo en el desarrollo de mi investigación. Estoy especialmente agradecido con la Dra. Verónica Domínguez por sus enseñanzas en los inicios de mi carrera, y por su valioso apoyo en los últimos años de mi investigación.

Las palabras no pueden expresar lo agradecido que estoy con mi madre y mi padre por haber motivado y apoyado mi deseo por conocer la naturaleza. Un especial agradecimiento a mis hermanos por haber fomentado mi acercamiento a la ciencia.

Finalmente expreso mi agradecimiento y aprecio a mi esposa por su apoyo incondicional.

ÍNDICE.

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCION	3
3.1. Interacciones interespecíficas.....	3
3.2. Sistemas artificiales para el estudio del origen y evolución de las interacciones interespecíficas.....	4
3.3. Plasticidad fenotípica en las interacciones biológicas.....	7
3.4. Dinámicas eco-evolutivas como un marco teórico para el estudio de las interacciones interespecíficas.....	10
3.5. La evolución rápida en las interacciones interespecíficas.....	12
3.6. El rescate evolutivo en las dinámicas eco-evolutivas.....	13
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	15
5. OBJETIVO GENERAL.....	15
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	15
6. ESTRATEGIA EXPERIEMENTAL.....	16
7. RESULTADOS.....	17
7.1. ECO-EVOLUTIONARY FEEDBACKS DRIVE SPECIES INTERACTIONS (ARTÍCULO PUBLICADO).....	17
7.2. SMALL MOLECULES AND AN ALTERNATIVE METABOLIC PATHWAY OF YEAST DRIVE THE ESTABLISHMENT OF AN EXPERIMENTAL FUNGAL- BACTERIAL COMMUNITY. (ARTÍCULO EN PREPARACION).....	18
8. CONCLUSIONES GENERALES.....	45
9. PERSPECTIVAS.....	46
10. REFERENCIAS.....	47

1. RESUMEN

En la biosfera, las especies viven en estrecha proximidad y pueden interactuar en diferentes maneras. Tales interacciones son dinámicas y se mueven a lo largo de un continuum entre antagonismo y cooperación. Debido a que las interacciones entre especies son la clave para entender las comunidades biológicas, es necesario conocer cómo estas surgen y evolucionan. Usando una comunidad artificial de dos especies, demostramos que los procesos ecológicos y la evolución rápida interactúan para influir en la dinámica de la simbiosis entre un eucariote (*Saccharomyces cerevisiae*) y una bacteria (*Rhizobium etli*). La interacción entre estas especies fue estudiada en un ambiente homogéneo (cultivo líquido) y en un ambiente estructurado (biofilm). En ambas condiciones, la secreción de moléculas pequeñas por el hongo fueron los procesos ecológicos claves que influyeron en la naturaleza y dinámica de la interacción. Encontramos que la formación del biofilm hongo-bacteria depende de la función de genes codificados en el plasmido simbiótico pD y el plasmido pA de la bacteria, y de un soforosido secretado por levadura, cuya estructura no había sido previamente reportada.

Además, definimos como la construcción del nicho y la evolución rápida interactúan para influir en la dinámica de la simbiosis entre un eucariote y una bacteria. Durante los cocultivos en un ambiente homogéneo, la actividad metabólica de levadura permitió el establecimiento de una relación comensal que cambió a un amensalismo y generó las condiciones necesarias para la evolución adaptativa de la bacteria. En este último estado, la población de la bacteria radia en más de cinco fenotipos que varían con respecto al transporte de nutrientes, estrategias metabólicas y regulación global. La diversificación evolutiva de las poblaciones bacterianas tiene un fuerte efecto en la comunidad; subsecuentemente la naturaleza de la interacción cambió de amensalismo a un antagonismo, en el cual la bacteria promueve la extinción de levadura. Nuestros resultados demuestran la importancia de la vía evolución-ecología en la persistencia de las interacciones y la estabilidad de las comunidades. Así, las dinámicas eco-evolutivas tienen el potencial para transformar la estructura y función de los ecosistemas.

2. ABSTRACT

In the biosphere, many species live in close proximity and can thus interact in many different ways. Such interactions are dynamic and fall along a continuum between antagonism and cooperation. Because interspecies interactions are the key to understanding biological communities, it is important to know how species interactions arise and evolve. Here we show that the feedback between ecological and evolutionary processes plays a fundamental role in the emergence and dynamics of species interaction. Using a two-species artificial community, we demonstrate that ecological processes and rapid evolution interact to influence the dynamics of the symbiosis between a eukaryote (*Saccharomyces cerevisiae*) and a bacterium (*Rhizobium etli*). The interaction between these species was studied in a homogeneous environment (liquid culture) and in a structured environment (biofilm). In both conditions, the secretion of small molecules by the fungus were the key ecological process that influenced the nature and dynamics of the interaction. We found that the mixed biofilm formation is dependent on the function of encoded genes in symbiotic plasmid and pA plasmid, and of a yeast secreted sophoroside whose structure had not been previously reported.

Furthermore, we outline how niche construction and rapid evolution interact to influence the dynamics of the symbiosis between a eukaryote and a bacterium. During co-cultivation in a homogeneous environment, yeast metabolic activity initially allows the establishment of a commensal relationship that switched to ammensalism and provided the selective conditions necessary for the adaptive evolution of the bacteria. In this latter state, the bacterial population radiates into more than five genotypes that vary with respect to nutrient transport, metabolic strategies and global regulation. Evolutionary diversification of the bacterial populations has strong effects on the community; the nature of interaction subsequently switches from ammensalism to antagonism where bacteria promote yeast extinction. Our results demonstrate the importance of the evolution-to-ecology pathway in the persistence of interactions and the stability of communities. Thus, eco-evolutionary dynamics have the potential to transform the structure and functioning of ecosystems.

3. INTRODUCCION

3.1. Interacciones interespecíficas

En la naturaleza, las especies están relacionadas por una red de complejas interacciones que son centrales para la estructura, composición y función de cualquier comunidad (Thompson, 1994). Aquí nos referiremos a las interacciones entre especies como “interacciones interespecíficas”, y este término será sinónimo de simbiosis y de interacciones biológicas. Las interacciones interespecíficas pueden ser mutualistas (todos los “compañeros” se benefician), commensalistas (uno se beneficia y el otro no es afectado), amensalista (una especie afecta el bienestar de otra sin recibir un beneficio) o parasíticas, sin embargo muchas interacciones interespecíficas son complejas o pobremente entendidas y no pueden ser incluidas en ninguna de estas categorías (Douglas, 1994). Tales interacciones son dinámicas y cambian a lo largo de un *continuum* entre antagonismo y cooperación (Relman, 2008; Ewald, 1987; Hayashi, 2006; Sachs *et al.*, 2011). El cambio en la naturaleza de las interacciones puede ser gradual o abrupto, pasando así de una interacción benéfica a una interacción antagónica (Figura 1).

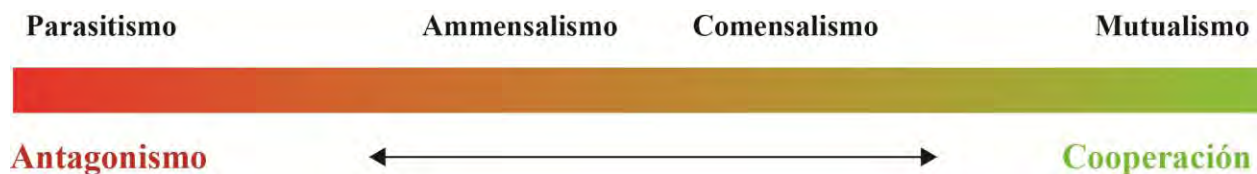


Figura 1. Las interacciones interespecíficas se desarrollan en un *continuum* entre el antagonismo y la cooperación. Por ejemplo, las relaciones antagónicas ocurren entre organismos patógenos y su hospedero. En contraste las relaciones mutualistas se dan entre organismos que cooperan mutuamente. En la parte media del *continuum* podemos ubicar las relaciones comensales, en las que una especie se beneficia de su compañero sin ocasionarle un daño o beneficio.

Las interacciones interespecíficas pueden ocurrir entre organismos filogenéticamente muy separados, tales como bacterias y eucariotes, o entre especies muy relacionadas, por ejemplo las interacciones entre insectos. Las interacciones pueden ser muy íntimas, como la simbiosis entre

la mitocondria y su hospedero eucariote a mas independientes como las interacciones predador-presa.

Existen interacciones interespecíficas que han surgido desde hace millones de años o algunas que solo tienen unos cuantos años de haberse establecido. En cada momento en cualquier ambiente una especie puede encontrarse con otra con la cual nunca ha interactuado, por ejemplo las interacciones que surgen cuando una especie ajena a un ecosistema (especie invasora o exótica) es introducida por el hombre o por procesos naturales tales como el transporte de semillas por el viento o las corrientes oceánicas. Estas interacciones pueden ser efímeras, o ser el principio de una interacción en la que ambas especies evolucionan para dar origen a una interacción que puede durar millones de años.

3.2. Sistemas artificiales para el estudio del origen y evolución de las interacciones interespecíficas.

A pesar de la importancia de las interacciones entre especies para la diversificación y organización de la vida, todavía conocemos poco acerca de cómo estas relaciones surgen y evolucionan (Thompson, 1999). Actualmente, se están siguiendo estrategias diferentes con respecto a las que solo se apoyan en el estudio de las interacciones naturales. Muchas de las simbiosis que conocemos son el resultado de la historia de interacción entre poblaciones ancestrales. Estas poblaciones ancestrales no están disponibles para analizarlas, y las condiciones ambientales bajo las cuales estas simbiosis se establecieron por primera vez no las conocemos. En contraste, los sistemas artificiales nos permiten conocer los procesos evolutivos que subyacen en el surgimiento de una interacción biológica y establecer relaciones causales entre cambios ambientales y cambios genéticos. Así también, los sistemas artificiales nos permiten experimentar de una manera controlada con las causas de la evolución y sus consecuencias en la fisiología del organismo y de la comunidad.

¿Cuáles son los orígenes de las simbiosis? una posibilidad es que ocurran encuentros aleatorios entre diferentes especies cuando los organismos migran dentro o fuera de una comunidad. Estas interacciones azarosas pueden desarrollarse en asociaciones de largo tiempo si las poblaciones de las especies se adaptan unas a otras. Por ejemplo, las especies invasoras se adaptan rápidamente

a nuevos nichos e interactúan con nuevos organismos (Callaway *et al.*, 2008), y nuevos patógenos constantemente infectan hospederos con los que nunca habían interactuado (Jeon & Jeon, 1976). Estas observaciones sugieren que las simbiosis pueden establecerse rápidamente. Una vez que las especies se encuentran, las condiciones del ambiente, por ejemplo la limitación de nutrientes, pueden favorecer la evolución de las simbiosis, como ha sido observado en un sistema artificial compuesto por un alga verde, un ciliado y una bacteria (Nakajima *et al.*, 2009). Las simbiosis también se pueden desarrollar de la diversificación genética en una población inicialmente homogénea (Blount *et al.*, 2008; Rosenzweig *et al.*, 1994; Rozen y Lenski 2000; Maharjan *et al.*, 2006). Los genotipos que coexisten pueden utilizar diferentes estrategias metabólicas o establecer una alimentación cruzada en la cual una especie consume un producto de la otra y viceversa (MacLean & Gudelj 2006). Por ejemplo, la evolución de una interacción en la que se establece una alimentación cruzada ha sido repetidamente observada en poblaciones homogéneas de *Escherichia coli* cultivadas en un ambiente con limitación de glucosa (Treves *et al.*, 1998). Comparadas con sus ancestros, todas las variantes mostraron un incremento en la afinidad por la captura de glucosa. Las variantes con mayor capacidad para capturar glucosa también excretan altos niveles de acetato debido a que tiene una mutación que inactiva a la acetil-CoA sintetasa que convierte acetato en acetil-CoA. Interesantemente, una variante consume el acetato debido a que adquirió una mutación que conduce a un incremento en la expresión de la acetil-CoA sintetasa (Rosenzweig *et al.*, 1994). Así, la diversificación evolutiva puede reducir la competencia entre genotipos y permitir la formación de nuevos nichos ecológicos, como también ha sido observado en organismos digitales (Chow *et al.*, 2004).

Desde que se establecen, las interacciones biológicas pueden cambiar rápidamente con la adición o eliminación de especies en la comunidad. Por ejemplo, la eliminación o reducción de las poblaciones de grandes mamíferos en la sabana Africana causó el rompimiento de un mutualismo planta-hormiga (Palmer *et al.*, 2008). Las interacciones biológicas también pueden evolucionar rápidamente, como ha sido observado en experimentos de laboratorio. Hansen *et al.* (2007) observaron que en un comensalismo, en el cual una especie se beneficia de otra y la otra no es afectada, puede evolucionar a una interacción similar a un parasitismo (Harcombe, 2010). Así, la naturaleza de la interacción pudo cambiar rápidamente. En contraste, algunas especies forman simbiosis que han durado millones de años (Ronsted *et al.*, 2005).

El análisis de la evolución del uso de hospedero en un grupo grande y diverso de interacciones, mostró que las simbiosis son filogenéticamente conservadas a tal grado que las especies relacionadas tienden a interactuar con especies similares (Gómez *et al.*, 2010).

El origen y persistencia del mutualismo es de particular importancia para los biólogos evolutivos. El mutualismo puede persistir si este no implica un costo en cualquiera de sus participantes. Sin embargo, muchas interacciones mutualistas se basan en pagar un costo para beneficiar a uno de los compañeros. Darwin dice, “La selección natural posiblemente no produce ninguna modificación en cualquier especie exclusivamente para el bienestar de otra especie” (Darwin, 1859).

Las comunidades microbianas construidas por especies que no tiene una historia de interacción previa proveen de una plataforma para conocer muchas cuestiones importantes acerca del origen de las interacciones naturales (Hillesland & Stahl, 2010; Kim *et al.*, 2008; Hansen *et al.*, 2007). Las interacciones naturales, las cuales han evolucionado desde hace millones de años, han recibido mucha atención y han sido extensivamente analizadas, por ejemplo la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas y las interacciones insectos-endosimbiontes.

Desde hace mucho tiempo se ha propuesto que la selección impuesta sobre un organismo, resulta en adaptaciones tales como nódulos en las raíces de las leguminosas, o el extremadamente largo espolón de la orquídea *Angraecum sesquipedale* predicho por Darwin para requerir un polinizador especializado (Darwin, 1862). Todas las interacciones además del mutualismo (Clark *et al.*, 2000; Itino *et al.*, 2001; Noda *et al.*, 2007), la competencia (Schluter & McPhail 1992), interacciones predador-presa (Brodie & Brodie, 1991), y las interacciones parasito-hospedero (Hafner & Nadler, 1988) afectan la evolución de las poblaciones. Para entender como las interacciones biológicas afectan a las adaptaciones evolutivas, no podemos confiarnos enteramente en el registro fósil o en poblaciones naturales. Los estudios comparativos de especies existentes pueden ayudarnos a reconstruir sus relaciones filogenéticas e inferir cuales diferencias entre estos participan en un tipo específico de simbiosis y cuáles no (Sachs & Simms, 2006). Sin embargo, es importante reconocer que las diferencias pueden deberse a causas muy distinta a la simbiosis, tales como accidentes históricos o “organismal constraints” (Gould & Lewontin, 1979).

Con las interacciones artificiales, es posible examinar el efecto de las interacciones en la evolución. Primero, es posible replicar la evolución de las poblaciones en las mismas condiciones ecológicas. Sin más la mayoría de las poblaciones que han evolucionado independientemente adquieren características dentro de una limitada ventana de tiempo, puede considerarse que estas pueden ser el resultado de la selección natural más que de procesos estocásticos (Lenski & Travisano, 1994; Travisano *et al.*, 1995). Segundo, las interacciones artificiales pueden estar conformadas de especies con genomas pequeños que pueden ser fácilmente secuenciados y genéticamente manipulables. Cada mutación o combinación de mutaciones pueden ser introducidas en su ancestro para evaluar su valor adaptativo (Weinreich *et al.*, 2006; Crozat *et al.*, 2005). Tercero, los sistemas artificiales utilizan microorganismos que pueden ser congelados sin perder su viabilidad, ofreciendo la oportunidad para replicar la evolución simbiótica y la coevolución. Cuarto, los microcosmos de especies que nunca han interactuado nos permite observar la evolución de las simbiosis incipientes. Quinto, en interacciones artificiales es posible separar los simbioses que han evolucionado y estudiarlos en condiciones no simbióticas o con otras especies (Bouma & Lenski, 1988; Hillesland & Stahl, 2010). Esto puede ser crucial para probar que participante es responsable de los cambios a nivel de la comunidad y cuando una característica evolutiva se adapta a un patrón específico. Finalmente, si múltiples simbioses pertenecientes a diferentes taxas son estudiados, será posible identificar reglas generales acerca de cómo las simbiosis afectan la evolución, para predecir en algún grado, como las interacciones biológicas pueden evolucionar.

3.3. Plasticidad fenotípica en las interacciones biológicas.

La plasticidad fenotípica es la habilidad de un organismo para expresar diferentes fenotipos dependiendo del ambiente biótico o abiótico al cual está expuesto (Agrawal, 2001). Los cambios fenotípicos de un genotipo pueden ser modificaciones morfológicas, químicas, fisiológicas, cambios en el desarrollo y modificaciones de comportamiento. La hipótesis de la “plasticidad adaptativa”, postula que la plasticidad fenotípica evoluciona para maximizar el “fitness” de una especie en ambientes espacial o temporalmente variables (Via & Lande, 1985; Dudley & Schmitt, 1996). Muchos trabajos de biólogos evolutivos y ecólogos, han aportado evidencias

experimentales que demuestran que la plasticidad fenotípica tiene un valor adaptativo y es el resultado de cambios genéticos (Dudley & Schmitt, 1996).

Cuando los individuos de dos especies interactúan, estos pueden ajustar sus fenotipos en respuesta a sus respectivos compañeros para establecer una interacción antagonista o mutualista. Los ecólogos evolutivos han tenido mucho interés en estudiar la plasticidad fenotípica que surgen en las interacciones interespecíficas. Así, el estudio de la respuesta fenotípica de una especie a otra es por definición una investigación de una interacción interespecífica. Muchos estudios analizan la respuesta fenotípica de la especie A a la especie B, sin embargo es importante considerar que en la naturaleza los organismos están interactuando simultáneamente con varias especies y están respondiendo de manera recíproca a sus compañeros de interacción en una escala de tiempo ecológico. Para Agrawal (2001), las interacciones recíprocas simplemente implican una respuesta de ida y vuelta en términos de cambios fenotípicos entre individuos, y no implican una simetría en la fuerza de la respuesta o en los efectos de un compañero en el otro.

Tompson (1988), propone una norma para estudiar la plasticidad fenotípica en las interacciones interespecíficas. La norma de interacción, es expresada como un genotipo-por-genotipo-por-interacción con el ambiente. En otras palabras, el fenotipo de un individuo o la naturaleza y la fuerza de una interacción entre especies está determinada por los genotipos de los individuos que interactúan y por las condiciones del ambiente en el cual ocurre la interacción. En contraste, Agrawal (2001) propone una redefinición del concepto de norma de interacción, en la cual se debe distinguir los efectos ambientales que son generados por el espacio de aquellos que generan la variación temporal. En esta última propuesta, el cambio fenotípico recíproco entre los individuos que interactúan, ocurre cuando la respuesta de una especie a la otra crea el ambiente al cual la otra especie puede posteriormente responder. Así, la fuerza y naturaleza de una interacción interespecíficas depende de la respuesta recíproca que ocurrió en el pasado entre los individuos. Es importante notar que la descomposición de la “norma de interacción” en aspectos espaciales y temporales permite hacer un análisis más detallado de la variación en las interacciones interespecíficas.

A pesar de que pocos trabajos se han conducido para demostrar que los cambios fenotípicos recíprocos ocurren en una escala de tiempo ecológico, existen muchos ejemplos que sugieren que

los cambios recíprocos ocurren con mucha frecuencia en la naturaleza. Por ejemplo, las interacciones entre probables mutualistas tales como leguminosas (Fabaceae) y bacterias fijadoras de nitrógeno (Rhizobia) demuestran la existencia de cambios fenotípicos recíprocos (Gage & Margolin, 2000). En los inicios de la interacción, la bacteria produce lipooligosacáridos (denominados factores de nodulación) como una respuesta a los flavonoides secretados por las raíces de la planta. En respuesta a los factores de nodulación, la planta curva los pelos radiculares alrededor de la bacteria para iniciar la formación del hilo de infección y posteriormente el desarrollo del nódulo. Después de otros eventos de señalización recíproca, la bacteria se diferencia en bacteroide que fija nitrógeno atmosférico. La reciprocidad determina el nivel en el cual la planta y la bacteria cooperan para intercambiar recursos (Gage & Margolin, 2000).

Los cambios fenotípicos recíprocos también ocurren en interacciones antagónicas. Por ejemplo, en las interacciones entre plantas y herbívoros, las plantas pueden inducir sus defensas dependiendo de la densidad de ataques que sufre, y los herbívoros pueden inducir contradefensas que dependen de la concentración de las defensas de las plantas que consumen (Bolter & Jongsma, 1995). El rango continuo de fenotipos inducidos por cada compañero ejemplifica un requisito distintivo de la hipótesis de la “carrera armamentista ecológica” porque esto permite escalar los cambios fenotípicos. Si estas respuestas no son continuas, la “carrera armamentista” no podría ocurrir en una escala de tiempo ecológico (Agrawal, 2001).

Debido a que las adaptaciones fenotípicamente plásticas tienen más probabilidades de evolucionar en ambientes variables que las adaptaciones fijas, y que las interacciones interespecíficas son intrínsecamente variables en tiempo y en espacio, la coevolución de las interacciones entre especies han dado como resultado la plasticidad fenotípica. Los cambios fenotípicos pueden resultar en la estructuración de las redes tróficas, en cambios ecológicos recíprocos en interacciones antagónicas y mutualistas, y en la evolución de las especies. A pesar de que los costos pueden limitar la evolución adaptativa de la plasticidad fenotípica, la ubicuidad de la plasticidad en las interacciones interespecíficas sugiere que los beneficios pueden superar a los costos en una amplia variedad de condiciones (Agrawal, 2001).

3.4. Dinámicas eco-evolutivas como un marco teórico para el estudio de las interacciones interespecíficas.

La evolución es el cambio de la frecuencia de genotipos dentro de especies o poblaciones, mientras que las dinámicas de comunidades representa el cambio de la abundancia de diferentes especies. Ambos tipos de cambios surgen de la interacción de los individuos entre uno y otro y con el ambiente. La genética de poblaciones y las dinámicas de población/comunidad tradicionalmente han hecho predicciones sin considerar una a la otra disciplina. Los ecólogos evolutivos y los biólogos de poblaciones recientemente han tomado en cuenta que los cambios ecológicos y evolutivos están íntimamente relacionados y pueden ocurrir en la misma escala de tiempo (Hendry & Kinnison, 1999; Hairston *et al.*, 2005). Esta consideración está revolucionando nuestro entendimiento de las fuerzas que gobiernan las dinámicas de los sistemas naturales. Si la evolución puede ocurrir en una escala de tiempo ecológico, los cambios ecológicos pueden directamente dar forma a la evolución y viceversa (Laland *et al.*, 1999; Post & Palkovacs, 2009).

La idea de que los procesos ecológicos pueden influir en las dinámicas evolutivas, incluso en escalas de tiempo cortas, ha sido durante mucho tiempo un foco de la biología evolutiva. El hecho de que la evolución pueda influir en la ecología también ha sido distinguida históricamente. Por ejemplo, tanto Darwin (1859) como Fisher (1930) reconocieron la interacción entre los procesos ecológicos y los evolutivos. Posteriormente, entre 1950 y 1960, unos cuantos ecólogos empezaron a plantear formalmente la hipótesis de cómo la evolución influye en los procesos ecológicos. Chitty (1952, 1960) afirma que los ciclos en las poblaciones de un roedor puede ser una consecuencia de la selección natural que favorece diferentes tipos de historias de vida en diferentes fases de un ciclo. Del mismo modo, Pimentel (1968) sostuvo que en la naturaleza la evolución proporciona bases para el control del número de herbívoros, parásitos, y predadores.

Varios estudios han mostrado que existe una bi-direccionalidad en la interacción entre las dinámicas ecológicas y evolutivas en una escala de tiempo contemporánea, lo cual da lugar a las dinámicas eco-evolutivas (Figura 2). Ahora se ha establecido una dirección de causalidad; los cambios ecológicos pueden causar cambios evolutivos en años o décadas (evolución contemporánea) (Hendry & Kinnison, 1999). La otra dirección de causalidad, de evolución contemporánea a dinámicas ecológicas, recientemente ha sido el foco de trabajos más detallados,

a pesar de que las explicaciones evolutivas para fenómenos ecológicos han existido desde hace mucho tiempo (Pelletier *et al.*, 2009).

Pelletier *et al.* (2009) sugiere que un objetivo importante debe ser elucidar la bi-direccionalidad de las dinámicas eco-evolutivas, también denominadas “retroalimentaciones eco-evolutivas” (Post & Palkovacs, 2009). Tales retroalimentaciones pueden surgir en diferentes escalas en espacio y tiempo y en diferentes niveles de la organización biológica (genes, individuos, poblaciones, comunidades y ecosistemas).

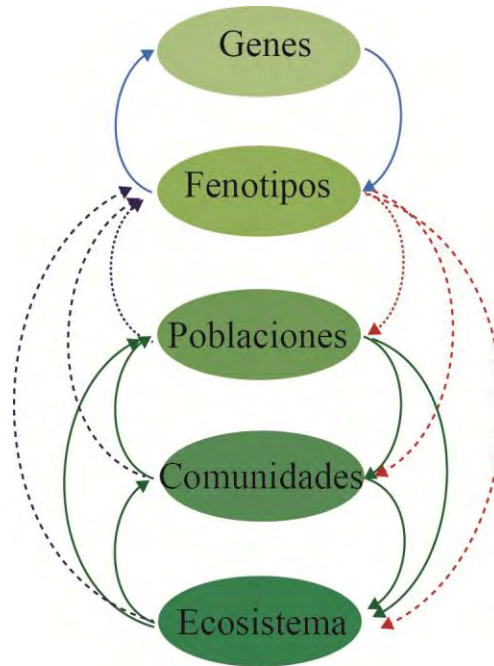


Figura 2. Modelo conceptual propuesto por Palkovacs & Hendry (2010) para entender las dinámicas eco-evolutivas. Los cambios en las poblaciones, comunidades y el ecosistema influyen en el fenotipo por la vía de la selección natural y la plasticidad (flechas punteadas de color negro). La selección es traducida en cambios evolutivos a través de la herencia genética (flechas azules). El fenotipo resultante después puede influir en las propiedades de las poblaciones, las comunidades y los ecosistemas (flechas punteadas de color rojo). Estos efectos pueden moverse entre los niveles de la organización ecológica a través de los efectos ecológicos tales como las interacciones tróficas (flechas verdes). Note que la plasticidad puede influir en los procesos ecológicos modificando los fenotipos en la ausencia de cambios genéticos. La retroalimentación entre procesos ecológicos y evolutivos es representada por las líneas punteadas negras y rojas respectivamente.

Algunos trabajos han identificado dinámicas eco-evolutivas a nivel de comunidades. Cuando dos especies, tales como un predador y una presa, interactúan, los cambios evolutivos en uno pueden influir en la selección y la demografía del otro, y viceversa (Fussmann *et al.*, 2007). Finalmente, cambios en el número de individuos, el tipo de recursos que ellos utilizan y su eficiencia al hacerlo pueden influir en un conjunto de funciones del ecosistema, tales como la descomposición, el ciclo de los nutrientes y la productividad primaria (Thompson, 1998).

Muchos estudios de las interacciones interespecíficas se han enfocado en determinar cómo los procesos ecológicos, por ejemplo los cambios ambientales, afectan la naturaleza de las interacciones (Duffy *et al.*, 2012; Seyedsayamdost *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2008). Por ejemplo, la naturaleza y fuerza de las interacciones entre ciertas plantas y hormigas depende de factores ambientales tales como la disponibilidad de nutrientes o luz, la presión de los herbívoros, o relaciones con otros organismos (Palmer *et al.*, 2008). Otros trabajos han mostrado cómo los procesos evolutivos pueden afectar la naturaleza de las interacciones entre especies (Yoshida *et al.*, 2003; Harmon *et al.*, 2009; Hillesland & Stahl, 2010; Gómez & Buckling, 2011; Lawrence *et al.*, 2012). Usando dos bacterias que habitan el suelo, Hansen *et al.* (2007) demostró que mutaciones simples en el genoma de una especie le permitió a esta adaptarse a la presencia de la otra, formando una asociación íntima y especializada. Un estudio reciente de la interacción entre una bacteria y un nematodo demostró que un cambio genético en la bacteria reversiblemente cambió la interacción de mutualismo a parasitismo (Somvanshi *et al.*, 2012).

3.5. La evolución rápida en las interacciones interespecíficas.

Thompson (1999) & Fussman (2007) hicieron una revisión de los estudios teóricos y empíricos para identificar los casos en los cuales los procesos evolutivos afectan significativamente la dinámica de las poblaciones, de las comunidades y los ecosistemas. La lista de trabajos continúa creciendo y ahora incluye análisis evolutivos en experimentos de campo a largo plazo y observaciones de poblaciones en ambientes cambiantes (Reznick *et al.*, 1997; Losos *et al.*, 1997; Schoener, 2011). Los estudios de poblaciones naturales muestran que los cambios evolutivos ecológicamente importantes pueden ocurrir rápidamente. Además, los trabajos de evolución experimental y los modelos matemáticos que conectan la ecología de poblaciones con cambios genéticos indican que la evolución rápida y la coevolución de las interacciones interespecíficas

pueden tener un gran efecto en la estructura y dinámica de las poblaciones (Frank, 1993; Turelli 1994; Abrams & Matsuda, 1997).

Debido a que las interacciones interespecíficas son la base de la organización de las comunidades, la evolución rápida de estas conexiones entre las especies tienen el potencial para generar un “efecto dómimo” a través de las comunidades. Si los cambios evolutivos rápidos son comunes en las interacciones interespecíficas, las cuestiones acerca de las relaciones a corto plazo entre la diversidad, la conectividad de las redes alimentarias y la estabilidad necesitarán considerar la evolución rápida. En palabras de Thompson, la cuestión más importante para contestar es cuando la persistencia de las interacciones y la estabilidad de las comunidades verdaderamente dependen de la evolución rápida que sintoniza las interacciones sobre escalas de tiempo de décadas, o cuando la evolución rápida es ecológicamente trivial (Thompson, 1998).

3.6. El rescate evolutivo en las dinámicas eco-evolutivas.

La viabilidad de la población de un organismo está determinada por la interacción de las influencias ambientales y las características fenotípicas que dan forma a las historias de vida e influyen en el comportamiento de los organismos. Una extendida visión en la ecología evolutiva ha sido que la evolución adaptativa puede optimizar el estado fenotípico de una población en el sentido de maximizar su “fitness” (Dieckmann & Ferriere, 2004). Basado en lo anterior, se espera que la evolución adaptativa siempre pueda mejorar el balance demográfico de una población, resultando en un gran tamaño de población, disminución del riesgo de extinción o incremento en la dispersión geográfica, por mencionar algunos ejemplos.

Este escenario se refleja en la teoría del “rescate evolutivo”. En términos generales, el rescate evolutivo ocurre cuando una población sujeta a cambios ambientales “funciona mejor” bajo la operación de procesos evolutivos que sin estos procesos; típicamente, la moneda del “rendimiento de la población” es el tamaño de la población y el tiempo de persistencia (Dieckmann & Ferriere, 2004; Gonzalez *et al.*, 2012). Históricamente, existen dos enfoques teóricos del rescate evolutivo. Un enfoque se basa en estudios de genética de poblaciones, para investigar como las mutaciones pueden reducir el riesgo de extinción de una población que ha alcanzado un reducido tamaño o tiene un crecimiento negativo causado por un cambio abrupto en el ambiente (Gomulkiewicz & Holt, 1995; Boulding, 2001; Whitlock & Burger, 2004; Orr &

Unckless, 2008). El otro enfoque utiliza genética cuantitativa para estudiar las condiciones bajo las cuales la selección le permite a una población realizar un óptimo movimiento evolutivo conforme el ambiente cambia gradualmente (Burger & Lynch, 1995; Burger & Krall, 2004). Estos dos enfoques teóricos del rescate evolutivo muestran una diferencia conceptual interesante en el tipo de cambio ambiental (abrupto versus gradual). Sin embargo, ambos enfoques se basan en que la evolución adaptativa inherentemente tiende a aumentar la viabilidad de la población.

A pesar de la larga tradición de describir los procesos evolutivos a través de conceptos de progreso y optimización, en 1932 Haldane señaló que no existía ningún principio general que previniera que la evolución adaptativa afectara el rendimiento de la población (Haldane, 1932). Un ejemplo viene de considerar el sobre-crecimiento de las plantas. Los árboles más altos capturan más luz mientras que generan sombra sobre sus vecinos. Como la selección hace que los árboles de mediana altura aumenten en tamaño, la fecundidad declina por que la mayoría de la energía del árbol se desvía de la producción de semilla para la producción de madera. Bajo estas circunstancias, es posible que le tome más tiempo al árbol para alcanzar su madurez. Así, el crecimiento arborescente como una respuesta evolutiva para la selección de la habilidad competitiva pueda causar abundancia y/o puede disminuir la tasa intrínseca de crecimiento de la población. La conclusión lógica de este proceso puede ser la extinción de la población, como fue explicado por Haldane.

Las dos décadas pasadas de investigación en ecología evolutiva teórica han aportado mucho para darle soporte a esta propuesta. El concepto de la retroalimentación eco-evolutiva (eco-evolutionary feedback loop) ha sido introducido para ligar la operación conjunta de los procesos ecológicos y evolutivos con las dinámicas de poblaciones. Las presiones de selección dirigiendo la evolución fenotípica pueden derivarse de modelos que describen globalmente el eco-evolutionary feedback loop (Metz, 1992; Rand, 1994; Champagnat *et al.*, 2006).

La salida de la optimización ocurre cuando la selección es dependiente de la frecuencia (Heino *et al.*, 1998). La dependencia de la frecuencia es responsable de las dinámicas eco-evolutivas tales como los ciclos piedra-papel-tijera en la frecuencia de los alelos, con ejemplos bien estudiados en la vida real (Sinervo & Lively, 1996). Una condición necesaria y suficiente para que la selección no sea dependiente de la frecuencia es que las características adaptativas afecten el

“fitness” de una manera monótona uni-dimensional; esto es, el “fitness” puede estar incrementando o decreciendo en función de una sola variable.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Muchos autores han enfatizado que en la naturaleza los organismos no existen como “entes solitarios”, por el contrario, existen estableciendo complejas interacciones en las cuales las especies se relacionan directamente o a través de especies intermediarias. Muchas interacciones naturales han existido desde hace millones de años, y han sido estudiadas extensivamente. Por ejemplo: la depredación entre mamíferos, la herbivoría de las plantas por insectos y una de las mejor estudiadas a nivel molecular es quizás el mutualismo entre leguminosas y bacterias fijadoras de nitrógeno. Estas interacciones surgieron desde hace millones de años, por lo tanto lo que conocemos de ellas es el resultado de diversos procesos que han dirigido su desarrollo. Para conocer cómo surgen y evolucionan las interacciones biológicas, es requisito que las especies involucradas no tengan una historia de interacción. Para esto, realizamos cocultivos de un eucariota unicelular (*Saccharomyces cerevisiae*) y una bacteria fijadora de nitrógeno (*Rhizobium etli*), los cuales no tienen antecedentes de establecer algún tipo de interacción natural.

5. OBJETIVO GENERAL

Conocer cómo los procesos ecológicos y evolutivos participan en el origen y evolución de las interacciones entre especies.

6. OBJETIVOS PARTICULARES.

- *Determinar la naturaleza de la interacción entre *R. etli* y *S. cerevisiae* a lo largo del tiempo.
- *Identificar los mecanismos moleculares involucrados en la interacción hongo-bacteria.
- *Identificar las causas ecológicas de la evolución de la interacción.
- *Conocer cómo los procesos evolutivos pueden determinar la naturaleza de una interacción biológica.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para estudiar cómo surgen y evolucionan las interacciones, *R. etli* CE3 y *S. cerevisiae* fueron cultivadas juntas (cocultivo) en medio rico durante 9 días en condiciones de agitación (ambiente homogéneo) y en medio mínimo formando biofilm (ambiente estructurado). Para poder definir la naturaleza de la interacción, realizamos seguimientos de los cambios en las dinámicas de las poblaciones, con los cuales calculamos el “fitness” de cada especie en cocultivos y en monocultivos. Se realizaron mediciones de parámetros ecológicos, tales como la disponibilidad de nutrientes (glucosa, aminoácidos y ácidos orgánicos) y cambios fisicoquímicos del ambiente. Cocultivando a *R. etli* CE3 con ~ 4700 mutantes de *S. cerevisiae* nos permitió establecer relaciones causales entre los cambios en el ambiente ocasionados por la levadura y su efecto en la naturaleza de la interacción. Así, se pudo establecer que la levadura secreta moléculas pequeñas que afectan el crecimiento de la bacteria y metabolitos que promueven el crecimiento de *R. etli*. Las moléculas pequeñas fueron purificadas por Cromatografía Líquida de Alta Precisión (HPLC por sus siglas en inglés) y caracterizadas por Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno y de Carbono (NMR^H y NMR^C, por sus siglas en inglés) para determinar su estructura molecular. De esta manera, encontramos que la levadura secreta dos moléculas pequeñas: ácido orótico en medio rico (ambiente homogéneo) y un sofrosido en medio mínimo en biofilms (ambiente estructurado). Ambas moléculas fueron la principal actividad de construcción del nicho por levadura que influyo directamente en el desarrollo y dinámica de la interacción..El ácido orótico inhibe el crecimiento de la bacteria y es la causa de la evolución adaptativa de *R. etli* en los cocultivos. Por otro lado, en medio mínimo en biofilms *S. cerevisiae* secreta un disacárido de sofrosa que solo inhibe el crecimiento de cepas de *R. etli* que carecen del plásmido simbiótico y del plásmido pA.

7. RESULTADOS

A continuación, se anexan dos manuscritos que contienen los resultados y detalles experimentales de investigación que realice durante mis estudios de doctorado, el primero es el artículo que fue publicado en *The ISME Journal*, el cual contiene los resultados del estudio de la interacción *S.cerevisiae-R. etli* en medio rico en un ambiente homogéneo. Los resultados del análisis de la interacción hongo-bacteria en biofilms en medio mínimo se presentan en un borrador de un artículo que estamos preparando para su publicación.

7.1. ECO-EVOLUTIONARY FEEDBACKS DRIVE SPECIES INTERACTIONS.

Andrade-Domínguez A, Salazar M, Vargas-Lagunas MC, Kolter R, Encarnación S. (2013). Eco-evolutionary feedbacks drive species interactions. *The ISME Journal*. doi:10.1038/ismej.2013.208

<http://www.nature.com/ismej/journal/vaop/ncurrent/full/ismej2013208a.html>

7.2. SMALL MOLECULES AND AN ALTERNATIVE METABOLIC PATHWAY OF YEAST DRIVE THE ESTABLISHMENT OF AN EXPERIMENTAL FUNGAL-BACTERIAL COMMUNITY. (ARTICULO EN PREPARACION).

Authors: Andrés Andrade-Domínguez, María del Carmen Vargas-Lagunas, Sergio Encarnación*

Affiliations:

Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México.

*Correspondence to: encarnac@ccg.unam.mx (S.E.)

ABSTRACT

Fungi and bacteria co-inhabit a wide variety of environments, typically coexist as communities, competing for resources and, often, are physically associated within biofilms. Interactions between bacteria and fungi can have dramatic effects on the survival, colonization, pathogenesis and symbiosis. Relatively little is known at the molecular level how the development of biological interactions occurs. A dual-species cocultivation model has been developed by using a plant symbiotic bacterium *Rhizobium etli* and the well-studied eukaryote *Saccharomyces cerevisiae* as a tractable system to identify molecular mechanisms that underlie multispecies microbial associations. We discovered that *S. cerevisiae* and *R. etli* CE3 in coculture constructed a mixed biofilm which biomass is ~10 times higher, more structured and stable with respect to single species biofilms. The increase in biomass in the mixed biofilm is the result of the establishment of a commensalism interaction type, which bacteria is the commensal and yeast the host. This interaction depends on the production of small molecules secreted by the fungus and the function of genes encoded on the symbiotic plasmid of the bacterium. Furthermore, we found that respiratory metabolism is essential for the establishment, development and maintenance of the fungus-bacterium interaction. These results are of general importance for our understanding of microbial interactions because the molecular elements involved in this interaction are not specific to this system.

INTRODUCCION

Muchos autores han enfatizado que en la naturaleza los organismos no existen como “entes solitarios”, por el contrario, las especies establecen complejas interacciones en las cuales las especies se relacionan directamente o a través de especies intermediarias. Las interacciones son dinámicas y cambian a lo largo de un "continuum" entre antagonismo y cooperación (Relman, 2008; Ewald, 1987; Hayashi, 2006; Sachs *et al.*, 2011). El cambio en la naturaleza de las interacciones puede ser gradual o abrupto, pasando así de una interacción benéfica a una interacción antagónica.

Cuando los individuos de dos especies interactúan, ellos pueden ajustar sus fenotipos en respuesta a sus respectivos compañeros para establecer una interacción antagonista o mutualista (Agrawal, 2001). Los cambios fenotípicos de un genotipo pueden ser modificaciones morfológicas, químicas, fisiológicas, cambios en el desarrollo y modificaciones de comportamiento. Así, el estudio de la respuesta fenotípica de una especie a otra es por definición una investigación de una interacción interespecífica.

A pesar de la importancia de las interacciones entre especies para la diversificación y organización de la vida, todavía conocemos poco a cerca de cómo estas relaciones surgen y evolucionan (Thompson, 1999). Actualmente, se están siguiendo estrategias diferentes con respecto a las que solo se apoyan en el estudio de las interacciones naturales. Muchas de las simbiosis que conocemos son el resultado de la historia de interacción entre poblaciones ancestrales. Estas poblaciones ancestrales no están disponibles para analizarlas, y las condiciones ambientales bajo las cuales estas simbiosis se establecieron por primera vez no las conocemos. En contraste, los sistemas artificiales nos permiten conocer los procesos que subyacen en el surgimiento de una interacción biológica y establecer relaciones causales entre cambios ambientales y cambios genéticos (Andrade-Domínguez *et al.*, 2013).

Las interacciones entre especies que interactúan por primera vez pueden desarrollarse en asociaciones estables si las poblaciones de las especies se adaptan unas a otras. Por ejemplo, las especies invasoras se adaptan rápidamente a nuevos nichos e interactúan con nuevos organismos (Callaway *et al.*, 2008), y nuevos patógenos constantemente infectan hospederos con los que nunca habían interactuado (Jeon K & Jeon M, 1976). Estas observaciones sugieren que las

simbiosis pueden establecerse rápidamente. Una vez que las especies se encuentran, las condiciones del ambiente, por ejemplo la limitación de nutrientes, pueden favorecer la evolución de las simbiosis, como ha sido observado en un sistema artificial compuesto por un alga verde, un ciliado y una bacteria (Nakajima *et al.*, 2009).

Las simbiosis también se pueden desarrollar de la diversificación genética en una población inicialmente homogénea (Blount *et al.*, 2008; Rosenzweig *et al.*, 1994; Rozen & Lenski 2000; Maharjan *et al.*, 2006). Los genotipos que coexisten pueden utilizar diferentes estrategias metabólicas o establecer una alimentación cruzada en la cual una especie consume un producto de la otra y viceversa (MacLean & Gudelj 2006).

Para investigar a nivel molecular la interacción entre un eucarionte y una bacteria durante la formación de biofilms mixtos, nosotros utilizamos como modelo de estudio el cocultivo de un eucariota unicelular (*Saccharomyces cerevisiae*) y una bacteria fijadora de nitrógeno (*Rhizobium etli*), los cuales no tienen antecedentes de establecer algún tipo de interacción natural.

RESULTADOS Y DISCUSION.

Comensalismo en el biofilm mixto.

La interacción biológica es la que se da entre un organismo y los elementos bióticos de un ecosistema. Es importante destacar que en los ecosistemas los microorganismos generalmente coexisten formando comunidades multicelulares, gobernadas por la competencia por los recursos nutricionales entre los miembros de la comunidad (Witzany, 2000). Las relaciones entre las especies pueden ser muy diversas, y varían desde una especie que se alimentan de otra (predación), hasta la de especies viviendo en un mutuo beneficio (simbiosis). Aquí nosotros analizamos una comunidad eucariote-bacteria para explorar experimentalmente las reglas que gobiernan la formación y desarrollo del biofilm mixto. *Saccharomyces cerevisiae* y *Rhizobium etli* son dos microorganismos que habitan la rizosfera de una gran diversidad de plantas tropicales. Cuando *S. cerevisiae* y *R. etli* son cultivados en medio mínimo con bajas concentraciones de glucosa (0.1%), estas especies se adhieren a superficies abióticas para formar biofilms (Figura 1). Interesantemente, *R. etli* CE3 y *S. cerevisiae* Σ 1278B Mat α forman un biofilm mixto que es ~2 veces mayor en biomasa que la suma de la biomasa de biofilms

mono-específicos (Figura 1). Además, a las 24 h el número de unidades formadoras de colonias (UFC)/cm² de *S. cerevisiae* y *R. etli* CE3 en el biofilm mixto es mayor con respecto a los biofilms de monocultivos (Figura suplementaria 1). Los análisis de microscopía láser confocal de biofilms teñidos con fluoróforos para determinar la viabilidad de las células, revelan que el biofilm mixto es estratificado y dominado por células de *R. etli*, las cuales cubren la mayor parte de la superficie. Puede verse que las levaduras forman parches los cuales están adheridos sobre una capa de bacterias y existen bacterias entre las células de levadura (Figura Suplementaria 2). En contraste, los biofilms mono-específicos de *R. etli* CE3 y *S. cerevisiae* tienen una menor complejidad estructural y presentan un mayor número de células muertas y la densidad de individuos es menor con respecto a sus respectivas poblaciones en los biofilms mixtos (Figura suplementaria 1, Figura suplementaria 3 y 4). Estos resultados sugieren que en los biofilms mixtos la levadura modifica el medio favoreciendo el crecimiento de la bacteria. Estas observaciones son congruentes con el hecho en el cual se aprecia que al crecer *R. etli* CE3 en la superficie de una placa de medio rico (PYD 0.1%) se observa un incremento en el número de colonias las cuales forman un halo de crecimiento alrededor de la colonia de levadura (Figura suplementaria 5). Lo anterior sugiere que *S. cerevisiae* excreta al medio factores que favorecen el crecimiento de *R. etli* CE3.

Para conocer la causa del incremento de la productividad en el biofilm mixto y la habilidad de la levadura para promover el crecimiento de la bacteria, evaluamos las concentraciones de ácidos orgánicos en el sobrenadante, los cuales se sabe que promueven el crecimiento de *R. etli*. Encontramos un incremento significativo en las concentraciones de malato, succinato y acetato en los sobrenadantes de biofilms mixtos con respecto a los biofilms mono-específicos de *R. etli* y *S. cerevisiae* (Figura suplementaria 6). Es bien conocido que en levadura estos metabolitos son generados por el ciclo de Krebs.

Para confirmar nuestra hipótesis de que el incremento de productividad del biofilm mixto depende de ácidos orgánicos excretados por levadura, evaluamos la capacidad promotora del crecimiento bacteriano por células de levadura deficientes en respiración (*rho*⁻), las cuales producen bajas concentraciones de ácidos dicarboxílicos (Andrade-Domínguez *et al.*, 2013). Encontramos que los biofilms mixtos formados entre *S. cerevisiae rho*⁻ y *R. etli* fueron significativamente menos productivos, pudiéndose apreciar una menor cantidad de bacterias en

la estructura del biofilm (Figura 2). En conjunto, estos resultados sugieren que en la comunidad *S. cerevisiae*-*R. etli* se establece una interacción biológica de tipo comensalismo, en la cual *R. etli* obtiene beneficios de *S. cerevisiae*.

El plásmido simbiótico y el plásmido “A” contiene elementos necesarios para el desarrollo del biofilm mixto.

El ensamble, desarrollo y la estructura de una comunidad ecológica, depende de la disponibilidad de recursos, la composición de especies, el solapamiento de los nichos y la capacidad de competencia entre las especies que componen a la comunidad (Tilman, 2004). Con el uso de una comunidad compuesta por dos bacterias no relacionadas, Kirkelund *et al.* (2007) muestran que la selección en un ambiente espacialmente estructurado conduce hacia la evolución de una interacción explotativa. Mutaciones en el genoma de una especie causa la adaptación de esta a la presencia de la otra, formando una asociación íntima y especializada. Nosotros demostramos que *S. cerevisiae* genera un nicho con factores que favorecen el establecimiento de *R. etli* CE3 (cepa silvestre) para formar una comunidad estructurada denominada biofilm mixto (Figura 1).

El genoma de *Rhizobium etli* CE3 está compuesto por un cromosoma y 6 plásmidos (pA, pB, pC, pD, PE y pF) (González *et al.*, 2006). Para conocer que elementos codificados en estos replicones pueden participar en el establecimiento del comensalismo, evaluamos la formación de biofilms mixtos entre levadura y cepas que carecen de estos replicones. Encontramos que la falta de los plásmidos pA, pB, pC y pF no afectan la habilidad de la bacteria para coexistir con levadura (Figura 4). En contraste, la cepa curada del plásmido simbiótico (pD⁻) es 25% ±7 menor con respecto a la cepa silvestre. Interesantemente, una cepa que carece de los plásmidos pA⁻/pD⁻ no puede coexistir con *S. cerevisiae* para formar un biofilm mixto y obtener los beneficios proporcionados por el hongo (Figura 4). Estos resultados fueron confirmados determinando el número de UFC/cm² de *R. etli* pA⁻/pD⁻ en el biofilm mixto con *S. cerevisiae*, los resultados claramente demuestran que el número de células viables de la cepa pA⁻/pD⁻ es significativamente menor con respecto a la cepa silvestre en cocultivo (Figura suplementaria 1).

Identificación de genes del plásmido simbiótico de *R. etli* que participan en el establecimiento del biofilm mixto.

El plásmido simbiótico contiene genes necesarios (de resistencia) para que *R. etli* pueda crecer en cocultivo con *S. cerevisiae*. Para identificar los genes de resistencia, utilizamos una librería de cósmidos que contienen fragmentos de digestiones parciales (con EcoRI) del genoma de *R. etli* CE3. Mediante hibridaciones DNA-DNA utilizando como sonda productos de PCR de genes del plásmido simbiótico, seleccionamos aquellas clonas de la librería que contenían fragmentos del plásmido simbiótico. Se realizaron cruza triparentales para transformar la cepa de *R. etli* pA⁻/pD⁻ con los cósmidos identificados.

Realizamos ensayos para evaluar inhibición del crecimiento y poder identificar los cósmidos que confieren capacidad a *R. etli* pA⁻/pD⁻ para crecer en presencia de levadura. Se identificó un cósmido que contiene 9 ORFs, de los cuales 7 corresponden a secuencias de inserción (IS), una proteína de secreción (RHE_PD00332) y un transportador tipo ABC de lantibióticos (RHE_PD00333) que se predice se encuentran en operon (Figura 5).

Consideramos como genes candidatos a los que codifican para transportadores de drogas (RHE_PD00332 y RHE_PD00333) y descartamos los ORFs anotados como secuencias de inserción, considerando que estas últimas no se conocen que participen en mecanismos de detoxificación de moléculas.

Para averiguar cuál de los dos genes candidatos es el responsable de conferir resistencia a *R. etli*, los genes RHE_PD00332, RHE_PD00333 y 567 pb río arriba (Figura suplementaria 7) fueron clonados para generar el vector pBBR1MCS-3-AD1. Además, generamos el vector pBBR1MCS-3-AD2, el cual solo contiene el gen RHE_PD00332 y 567 pb río arriba (Figura suplementaria 7). Estos vectores se utilizaron para transformar la cepa de *R. etli* pA⁻/pD⁻, las cuales denominamos AD1 y AD2. La cepa curada fue transformada con el vector pBBR1MCS-3 que no acarrea ningún inserto, esta cepa la denominamos p-vac y la utilizamos como control.

Los genes RHE_PD00332 y RHE_PD00333 le confieren capacidad a *R. etli* pd- para coexistir y formar biofilm con *S. cerevisiae*.

Se evaluó la formación de biofilms en mono y cocultivo de las cepas de *R. etli* Pd-AD1, Pd-AD2 y Pd-vac en medio mínimo dextrosa (Dextrosa 5.55 mM, Uracilo 17.8 μ M y Biotina 2 μ g/L).

Encontramos que el biofilm mixto de la cepa Pd-AD1 es \sim 30% mayor que el de la cepa Pd-vac. Sin embargo, el biofilm mixto de AD2 es menor que el de AD1, pero mayor en un \sim 16 % que el control negativo (Figura 6). Considerando estos resultados, proponemos que los dos transportadores (RHE_PD00332 y RHE_PD00333) contribuyen para que la cepa curada del plásmido simbiótico pueda formar biofilm mixtos con *S. cerevisiae*.

Realizamos ensayos en medio mínimo dextrosa (0.3% agar) para evaluar el tamaño de colonias de las cepas AD1, AD2, p-vac y CE3 (wt.) en presencia de *S. cerevisiae*. Encontramos que las colonias de AD1 y AD2 son de mayor tamaño que las de p-vac, pero el crecimiento es menor que la cepa silvestre (Figura 6). Esto muestra que los genes RHE_PD00332 y RHE_PD00333 complementan parcialmente. Los datos indican que existen otros genes en el plásmido simbiótico y en el plasmido pA que en conjunto confieren la capacidad a *R. etli* para estructurar una comunidad con *S. cerevisiae*.

***S. cerevisiae* produce una molécula pequeña con actividad bacteriostática.**

Para conocer qué factores afectan a *R. etli* pA⁻/pD⁻, nosotros evaluamos la actividad inhibitoria de extractos metanolicos de sobrenadantes de cultivos en medio mínimo de *S. cerevisiae*. Encontramos que levadura secreta un metabolito soluble en metanol, el cual inhibe el crecimiento de *R. etli* pA⁻/pD⁻ pero no de la cepa silvestre. El extracto metanolico fue fraccionado por HPLC (Figura Suplementaria 8) e identificamos un compuesto con actividad bacteriostática, al cual denominamos Sc2A (Figura Suplementaria 9).

Para determinar la estructura molecular de Sc2A se utilizaron 20 mg y se analizaron mediante Resonancia Magnética Nuclear. Se realizaron los siguientes análisis: RMN-H¹ 400 MHz, RMN-C¹³ 400 MHz, gHMBC, TOCSY y COSY.

El espectro de RMN- ^1H mostró dos protones en singulete, uno en 5.1 p.p.m y el otro en 4.4 p.p.m., y 8 protones en doblete entre 4.23 y 2.77 p.p.m. El espectro de RMN- ^{13}C mostró 2 señales de carbonos carbonilo, 11 señales C-H y 6 señales carbonos CH_2 .

RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz): δ 5.1 d ($J= 3.6$ Hz), 4.4 d ($J= 8$ Hz), 4.23 dd ($J= 9, 4.8$ Hz), 3.79 t ($J= 10.8, 14.4$ Hz), 3.73 m, 3.67 m, 3.639 m, 3.63 dd ($J= 8, 9.2$ Hz), 3.53 dd ($J= 5.6, 5.2$ Hz), 3.36 dd ($J= 3.6, 4$ Hz), 3.31 dd ($J= 8, 8$ Hz), 3.10 dd ($J= 8, 7.6$ Hz), 2.77 dd ($J= 4.4, 6.8$ Hz), 2.61 m, 2.46 m, 2.33 m, 2.12 m. **RMN ^{13}C -DEPT (CD_3OD , 400 MHz):** δ 181.2 (C), 175.9 (C), 98.1(CH), 93.8 (CH), 78.05 (CH), 78.02 (CH), 76.30 (CH), 74.92 (CH), 73.80 (CH), 73.11 (CH), 71.78 (CH), 71.72 (CH), 64.37 (CH_2), 62.87 (CH_2), 62.72 (CH_2), 57.24 (CH), 30.70 (CH_2), 26.19 (CH_2), 28.21 (CH_2). **IR Pastilla de KBr:** 3416.34 cm^{-1} (O-H), 1642.10 (C=O), 1405.44 (C-OH), 1242.93 (C-O-C), 1040.36 (C-H), 598.48 (O-C-O). **Rotación óptica** $[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ +13.7° (c 0.58, H_2O).

Con estos resultados se propone que Sc2A es un soforosido compuesto por dos moléculas de sofrosa unidas por una cadena esterificada (Figura 9). Para nuestro conocimiento, esta molécula no ha sido previamente reportada. Las moléculas naturales más similares a Sc2A son los soforolipidos, los cuales están formados por una molécula de sofrosa unida a un ácido graso hidroxilado por un enlace glucosídico (Cavalero & Cooper, 2003). Los soforolipidos son producidos por levaduras como *Candida bombicola*, *C. apicola*, and *Wickerhamiella domercqiae*. Ha sido demostrado que los soforolipidos naturales tienen actividad antibacteriana (Shah *et al.*, 2007), sin embargo no se conocen los procesos biológicos en los que participan y el papel que juegan en las comunidades microbianas.

Sc2A se acumula en fase estacionaria y tiene efectos en la organización de la colonia de *S. cerevisiae*.

Para conocer aspectos biológicos relacionados con el soforosido, nosotros analizamos la tasa de producción y el efecto fisiológico de esta molécula en *S. cerevisiae*. Encontramos que en medio mínimo con dextrosa la molécula se sintetiza de forma constitutiva, la máxima tasa de síntesis (Sc2A $\mu\text{g/ml/DO}_{600\text{nm}}$) ocurre en la fase media exponencial y su concentración en el medio incrementa al aumentar la densidad celular, alcanzando una máxima concentración en fase

estacionaria (Figura 8). También, realizamos experimentos para evaluar el efecto que Sc2A puede tener en la morfología de las células y en la organización de las colonias. Encontramos que las células que crecen en presencia de Sc2A forman colonias morfológicamente irregulares (Figura 9A), similares a la morfología que se aprecia en colonias en estado de carencia de nutrientes, por el contrario en los controles las colonias son circulares con bordes definidos. Con estas evidencias sugerimos que los cambios morfológicos de las colonias, son inducidos por moléculas que se acumulan en el medio circundante y promueven la disgregación para poder colonizar sitios con mayor disponibilidad de nutrientes. Proponemos que Sc2A es una molécula que tiene un papel en la comunicación célula-célula (organización de la colonia), en respuesta a cambios ambientales (disgregación y crecimiento invasivo) y en la interacción con otros microorganismos (actividad bacteriostática).

CONCLUSIONES.

Darwin usa la metáfora de un “tangled bank” para describir las complejas interacciones entre las especies. Estas interacciones pueden ser antagonistas o involucrar predación, herbivoría y parasitismo, o mutualistas, tales como las que involucran la polinización de flores por insectos o la asociación entre plantas y bacterias fijadoras de nitrógeno. La comunidad en un biofilm puede ser similar a un bosque tropical, quizás no tener su complejidad, pero si su importancia en términos del funcionamiento del ecosistema (Battin et al, 2003). Además, un biofilm mixto de organismos modelos (por ejemplo *S. cerevisiae* y *R. etli*) puede ser una comunidad fácilmente reconstruida en condiciones controladas para conocer las reglas que gobiernan el ensamble, funcionamiento y evolución de las interacciones (Thompson, J. N., 1994). En este trabajo mostramos cómo la interacción entre dos especies puede tener un marcado efecto en comportamientos multicelulares de las especies involucradas en la interacción, como es la formación de biofilms. La secreción de una molécula pequeña por *S. cerevisiae* y los elementos genéticos (el plásmido simbiótico y pA de *R. etli*) de la bacteria fueron claves para la interacción hongo-bacteria y el establecimiento de una comunidad estructurada (biofilm mixto). También mostramos que levadura provee condiciones favorables para el desarrollo de la bacteria, lo cual se reflejó en una comunidad mas productiva y dinámica con respecto a los monocultivos (Fig.1 y 3).

Aquí describimos por primera vez la estructura molecular de un soforosido secretado por *S. cerevisiae* (Figura 7), el cual puede funcionar como un factor que determine el curso de una interacción, y además puede estar involucrado en procesos relacionados a la organización y comunicación de la población de levadura en etapas tardías del desarrollo de las colonias (Figura 9). El estudio de los diversos tipos de interacciones biológicas es la clave para entender a las diversas comunidades de microorganismos, desde las que existen en la rizosfera hasta aquellas que se desarrollan en nuestro cuerpo.

MATERIALES Y METODOS.

Cepas utilizadas y cultivo.

Las cepas de *R. etli* y *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio se describen en la tabla 1. *R. etli* fue propagado rutinariamente en medio rico PY (0.3% de extracto de levadura y 0.5% de peptona de caseína, 7 mM de CaCl₂) con sus respectivos antibióticos. *S. cerevisiae* se cultivo en medio rico YPD (1% de extracto de levadura, 2 % de peptona de caseína y 2% de dextrosa).

Cultivo y desarrollo de biofilms.

Los cultivos para la formación de biofilms mixtos o monoespecíficos, se desarrollaron en medio mínimo dextrosa (KH₂PO₄ 1.6 Mm, MgSO₄ 0.83 mM, NH₄CL 10 mM, CaCl₂ 5 mM, FeCl₃.6H₂O 1.84 μM, Dextrosa 5.55 mM, Uracilo 17.8 μM y Biotina 2 μg/L). Los monocultivos de *R. etli* y *S. cerevisiae* se inocularon a una DO_{600 nm} = 0.2, para los cocultivos de *R. etli* y *S. cerevisiae* se inoculo a una DO_{600 nm} = 0.133 y 0.066 respectivamente.

Cinética de formación de biofilms.

Para evaluar la formación de biofilms a través del tiempo, se utilizaron placas de 96 pozos de cloruro de polivinilo con fondo en forma de U (Becton Dickinson, # catalogo 353911). En cada pozo se colocaron 150 μl de cultivo, se incubaron en cámara húmeda en reposo a 30 °C. A intervalos de tiempo se retiro el medio de cultivo y se agregaron 150 μl de una solución acuosa de cristal violeta al 1 % y se dejo incubar 15 minutos. El colorante se retiró y se realizaron lavados para eliminar el exceso de cristal violeta. Para cuantificar la incorporación del colorante se agregaron 150 μl de etanol absoluto y se cuantificó la absorbancia a 600 nm en un lector de microplatos (Biorad, Modelo 3550-UV). Para cada condición y tiempo de muestreo se realizaron

más de 6 experimentos independientes. El desarrollo del biofilm también fue evaluado en vidrio como sustrato para la adherencia, para lo cual se colocó 1 ml de cultivo en tubos de vidrio de 1x10 cm con tapa plástica.

MICROSCOPIA.

Para caracterizar la estructura del biofilm e identificar eventos en el desarrollo del mismo, se filmó el biofilm con un microscopio invertido a intervalos de 2 horas las primeras 12 hrs y cada 6 hrs durante 3 días. Se realizó Microscopia Laser Con Focal (MLCF) a las 10, 24 y 96 hrs. Para obtener las imágenes de MLCF, se utilizaron portaobjetos de vidrio como sustrato, los cuales se colocaron en cultivos de 250 ml. Los portaobjetos se lavaron 2 veces con medio mínimo fresco y las células fueron teñidas con el Kit LIVE/DEAD BacLight (Molecular Probes, L7007), mediante esta metodología fue posible identificar las poblaciones de células vivas o muertas tanto en monocultivos como en cocultivos.

Purificación del metabolito que afecta el crecimiento de *R. etli* CFNX89

Condiciones de cultivo

Para la obtención del metabolito que afecta el crecimiento de *R. etli* pA⁻/pD⁻, se realizó un cultivo de *S. cerevisiae* Σ 1278b MAT *a/α ura 3-52/ura 3-52*, en medio mínimo líquido (KH₂PO₄ 1.6 mM, MgSO₄ 0.83 mM, NH₄Cl 10 mM, CaCl₂ 1.5 mM, FeCl₃.6H₂O 1.84 μM, Dextrosa 16.2 mM, Uracilo 17.8 μM y Biotina 2 μg/L). 2 litros de cultivo fueron inoculados con *S. cerevisiae* Σ 1278b MAT *a/α* a una DO_{600nm} de 0.1 y el cultivo se desarrolló sin agitación a 30 °C durante 24 h. El cultivo se filtró con una membrana de 0.22μm para eliminar las células, y se liofilizó a sequedad. El liofilizado se maceró con 200 ml de metanol absoluto durante 24 hrs a 30 °C. El extracto metanólico se filtró para eliminar partículas insolubles y se liofilizó quedando aproximadamente 3.65 g. este extracto se maceró con 50 ml de una mezcla de Acetonitrilo-metanol 4:1 durante 24 hrs a 30 °C. se obtuvo 1.24 g de precipitado y compuestos solubles en la mezcla acetonitrilo-metanol. Para identificar la fracción con el compuesto activo, a cada extracto se le determinó la capacidad de inhibición del crecimiento de *R etli* pd- en placas de PY.

Purificación por RP-HPLC.

La fracción bioactiva se disolvió en agua y se separó por HPLC con una columna de fase reversa C-18 (COLUMNA: Hypersil 10 C18 P#0022, 250X100, S#9516550; Mtachem Tecnologías Inc., DETECTOR: waters 996, Photodiode Array Detector, Bombas: 515 HPLC Pump, Waters , 510 HPLC Pump, Waters, Controlador de gradiente: Waters). Se realizaron inyecciones de 100 µl y se monitorio la separación a 282 nm. Cada pico se colectó y se determinó su bioactividad, el pico con capacidad de inhibir el crecimiento de *R. etli* pd- tiene un tiempo de retención de 11.5 y elución con Acetonitrilo 48% y 52% de agua.

Elucidación de la estructura de Sc2A.

Para de determinar la estructura molecular de Sc2A se utilizaron 20 mg y se analizaron mediante Resonancia Magnética Nuclear. Se realizaron los siguientes análisis: RMN-H 400 MHz, RMN-C 400 MHz, gHMBC, TOCSY y COSY. Los análisis se realizaron en la Unidad de Servicios del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Los resultados fueron interpretados por la Dra. Yesenia Herrera Salgado.

REFERENCIAS

- Andrade-Domínguez A, Salazar E, Del Carmen Vargas-Lagunas M, Kolter R, Encarnación S. (2013). Eco-evolutionary feedbacks drive species interactions. *ISME J* 1–14. DOI: 10.1038/ismej.2013.208
- Battin TJ, Kaplan LA, Newbold DJ, Hansen CM. (2003). Contributions of microbial biofilms to ecosystem processes in stream mesocosms. *Nature* 426: 439–442.
- Blount ZD, Borland CZ, Lenski RE. (2008). Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7899–7906.
- Boucherie H, *et al.* (1995). Differential synthesis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides in stressed yeast cells. *FEMS Microbiol Lett* 125: 127-33
- Callaway R, Cipollini D, Barto K, Thelen G, Hallett S, Prati D, Stinson K, Klironomos J. (2008). Novel weapons: invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology* 89: 1043–1055.

- Cavalero DA, Cooper DG. 2003. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC22214. *J Biotechnol* 103: 31-41.
- De Craene JO, *et al.* (2001). The Npr1 kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *J Biol Chem* 276(47): 43939-48.
- Dean N, *et al.* (1997). The VRG4 gene is required for GDP-mannose transport into the lumen of the Golgi in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 272(50): 31908-14.
- Dickinson JR, *et al.* (2003) The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278(10): 8028-34.
- Ewald PW. (1987). Transmission Modes and Evolution of the Parasitism-Mutualism Continuum. *Ann N Y Acad Sci* 503: 295–306.
- Hayashi T. (2006). Breaking the barrier between commensalism and pathogenicity. *Science* 313: 772-773.
- Jeon K, Jeon M. (1976). Endosymbiosis in amebas—recently established endosymbionts have become required cytoplasmic components. *J Cell Physiol* 89: 337–344.
- MacLean R, Gudelj I. (2006). Resource competition and social conflict in experimental populations of yeast. *Nature* 441: 498–501.
- Maharjan R, Seeto S, Notley-McRobb L, Ferenci T. (2006). Clonal adaptive radiation in a constant environment. *Science* 313: 514–517.
- Boeckstaens M, Bruno A, Marini AM. (2007). The yeast ammonium transport protein Mep2 and its positive regulator, the Npr1 kinase, play an important role in normal and pseudohyphal growth on various nitrogen media through retrieval of excreted ammonium. *Mol Microbiol* 64 (2): 534–546.
- Miller JP, *et al.* (2005). Large-scale identification of yeast integral membrane protein interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(34): 12123-8.
- Mullner H, *et al.* (2005). YEH2/YLR020c encodes a novel steryl ester hydrolase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280(14): 13321-8.
- Nakajima T, Sano A, Matsuoka H. (2009). Auto-/heterotrophic endosymbiosis evolves in a mature stage of ecosystem development in a microcosm composed of an alga, a bacterium and a ciliate. *BioSystems* 96: 127–135

- Relman DA. (2008). “Til death do us part”: coming to terms with symbiotic relationships. *Nature Rev Microbiol* 6: 721–724.
- Romero PA, *et al.* (1999). Mnt2p and Mnt3p of *Saccharomyces cerevisiae* are members of the Mnn1p family of alpha-1,3-mannosyltransferases responsible for adding the terminal mannose residues of O-linked oligosaccharides. *Glycobiology* 9(10): 1045-51.
- Rosenzweig RF, Sharp RR, Treves DS, Adams J. (1994). Microbial evolution in a simple unstructured environment: genetic differentiation in *Escherichia coli*. *Genetics* 137: 903–917.
- Rozen DE, Lenski RE. (2000). Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. VIII. Dynamics of a balanced polymorphism. *Am Nat* 155: 24–35.
- Sachs JL, Skophammer RG, Regus JU. (2011). Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 10800–10807.
- Shah V, Badia D, Ratsep P. 2007. Sophorolipids having enhanced antibacterial activity. *Antimicrob Agents Ch* 51:397–400.
- Stevenson BJ, *et al.* (1995). Mutation of RGA1, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 9(23): 2949-63.
- Thompson JN. (1999). The Evolution of Species Interactions. *Science* 284: 2116–2118.
- Thompson JN. *The Coevolutionary Process* (Univ. of Chicago Press, Chicago, IL, 1994).
- Tilman D. (2004). A stochastic theory of resource competition, community assembly and invasions. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:10854–10861.
- Vallee B, Riezman H. (2005). Lip1p: a novel subunit of acyl-CoA ceramide synthase. *EMBO J* 24(4): 730-41.
- Witzany, G. (2000). *Life: The Communicative Structure*. Norderstedt, Libri.

FIGURAS

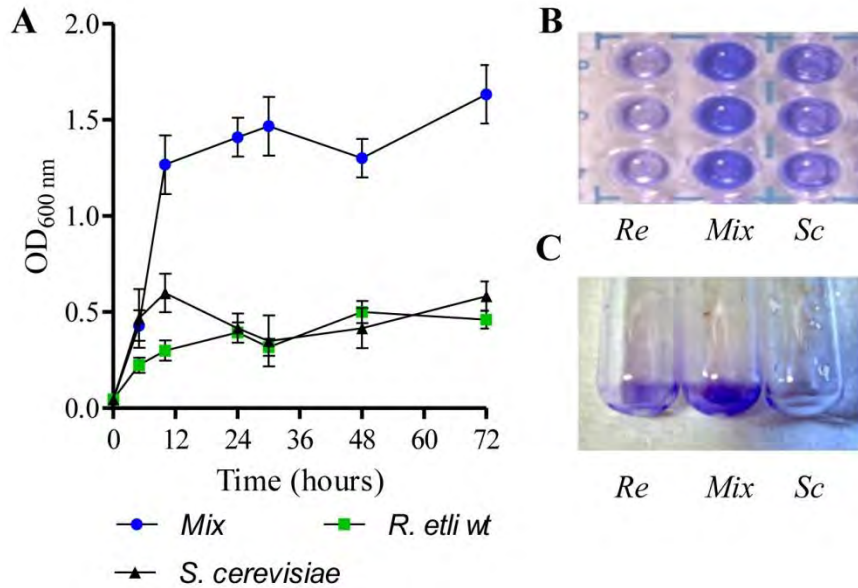


Figura 1.- El biofilm mixto es más productivo en biomasa que los monocultivos. **A)** Cinética de formación de biofilm (cuantificación con cristal violeta, DO_{600 nm}) de monocultivos y cocultivos. Los monocultivos se inocularon a una DO_{600 nm} = 0.2, para los cocultivos de *R. etli* y *S. cerevisiae* se inoculo a una DO_{600 nm} = 0.1 y 0.1 respectivamente. Los valores graficados corresponden al promedio de valores obtenidos en 6 experimentos independientes, las barras de error corresponden a la desviación estándar. **B-C)** Imágenes de biofilms de 24 hrs teñidos con cristal violeta, **B)** biofilms formados en pozos de PVC y **C)** biofilms formados en tubos de vidrio. Monocultivos: *Re*, *R. etli* CE3; *Sc*, *S. cerevisiae* Σ 1278B Mat α ; *Mix*, biofilm mixto.

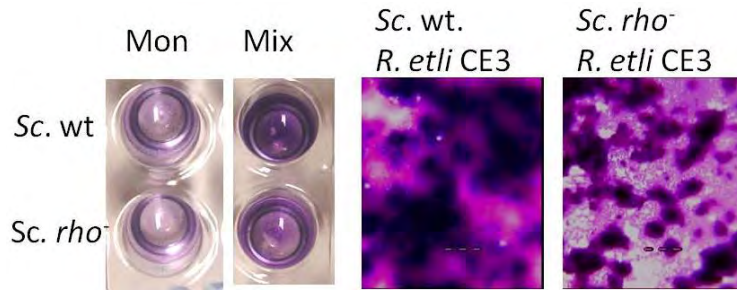


Figura 2. El establecimiento del comensalismo en el biofilm mixto depende del funcionamiento mitocondrial de levadura. Biofilms monoespecificos (Mon) y mixtos (Mix) de la cepa silvestre de levadura (*Sc. wt.*) y de una cepa que carece del funcionamiento mitocondrial (*Sc. rho-*). Imágenes representativas de posos de PVC teñidos con cristal violeta para visualizar la formación de biofilms a las 24 horas de cultivo. Microscopia de biofilms mixtos formados en el fondo de los posos de PVC.

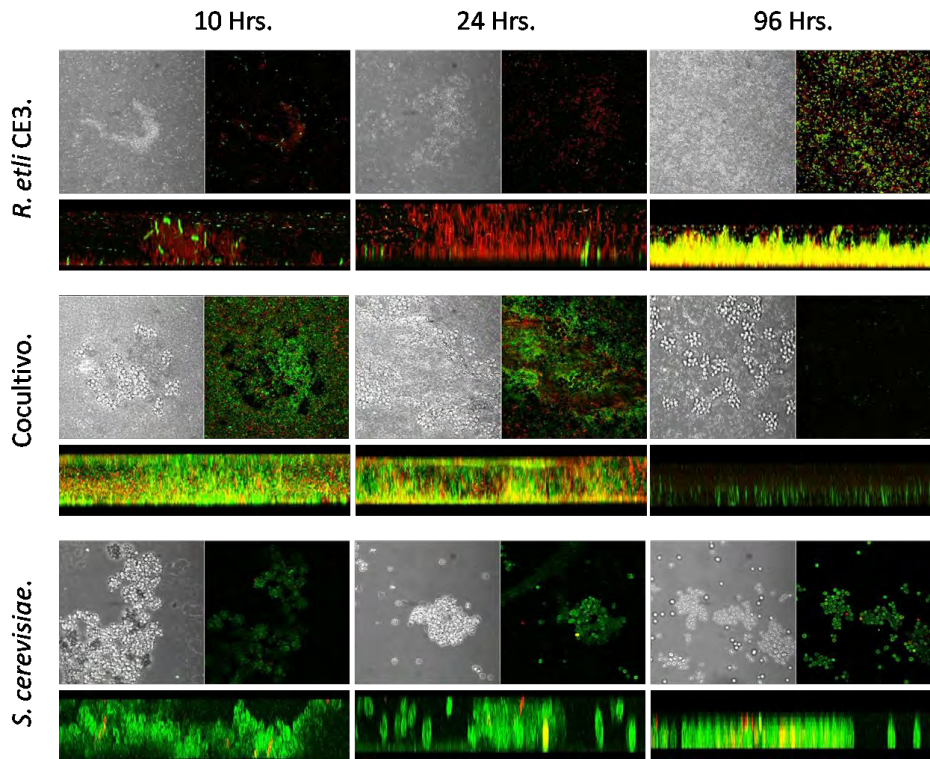


Figura 3.- Imágenes de biofilms mixtos y monoespecificos obtenidas mediante microscopia laser con focal. Se muestra la imagen de contrastes de fases y de fluorescencia. Bajo cada recuadro se presenta una proyección en el eje z de cada imagen.

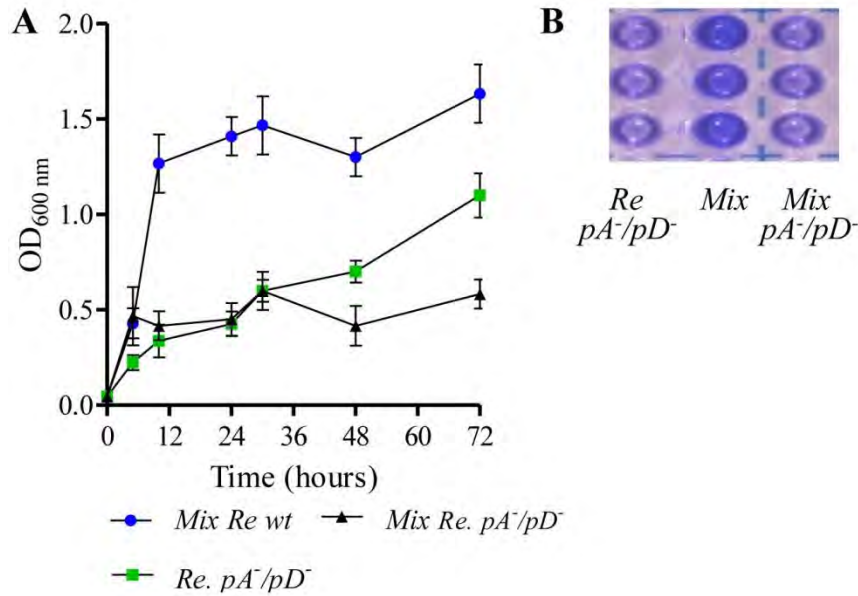


Figura 4.- El plásmido simbiótico pD y el plásmido pA de *R. etli* contiene elementos genéticos que le permite a la bacteria coexistir y formar una comunidad estructurada con *S. cerevisiae*. **A)** cinética de formación de biofilm en monocultivo y cocultivo de la cepa silvestre de *R. etli* CE3 (*Mix Re. wt*) y *R. etli pA⁻/pD⁻*. Valores de absorbancia del cristal violeta vs tiempo en hrs. **B)** Biofilms de 24 hrs formados en pozos de PVC teñidos con cristal violeta. Biofilm mixto de *R. etli wt-S. cerevisiae S1278B (Mix)*; Biofilm mixto de *R. etli pA⁻/pD⁻-S. cerevisiae S1278B (Mix pA⁻/pD⁻)*; monocultivo de *R. etli pA⁻/pD⁻* (*Re pA⁻/pD⁻*).

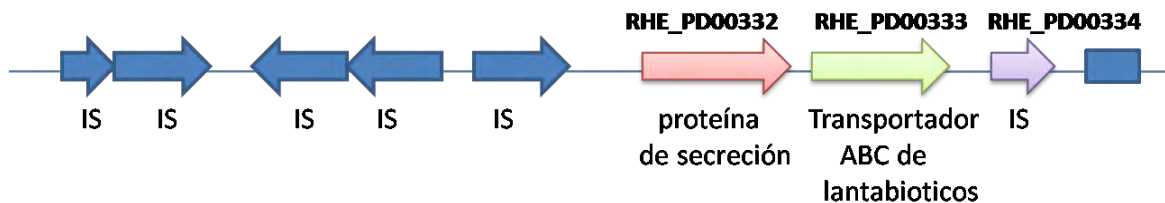


Figura 5.- Esquema de los genes contenidos en el cósmido que complementa a *R. etli pA⁻/pD⁻*.

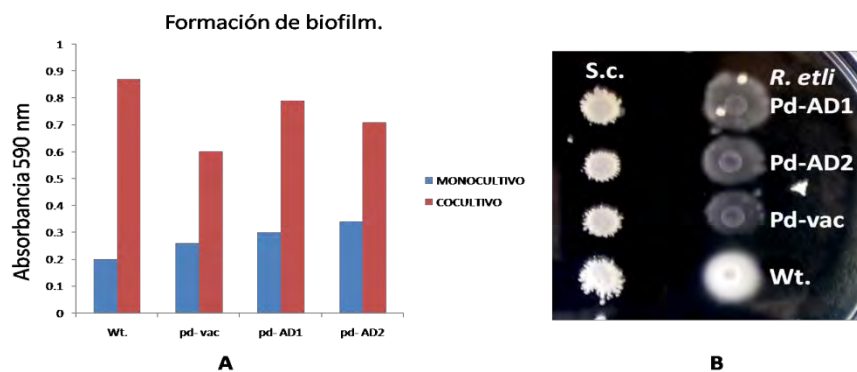


Figura 6.- A) Grafico de formación de biofilm en monocultivo y cocultivo de cepas de *R. etli*. B) Crecimiento de cepas de *R. etli* en medio mínimo dextrosa (0.3 % agar) en presencia de *S. cerevisiae*.

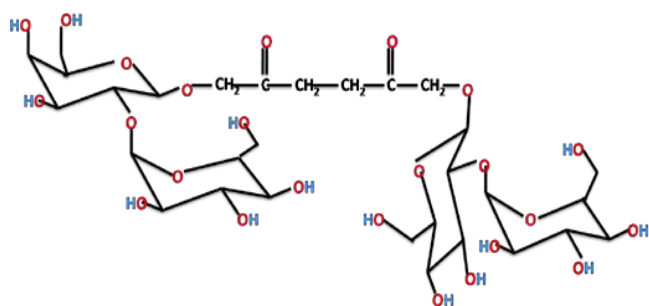


Figura 7. Estructura molecular propuesta para Sc2A. C₃₀H₅₀O₂₄, P.M. 794.26. Se trata de un soforosido constituido por dos moléculas de soforosa unidas por una cadena esterificada.

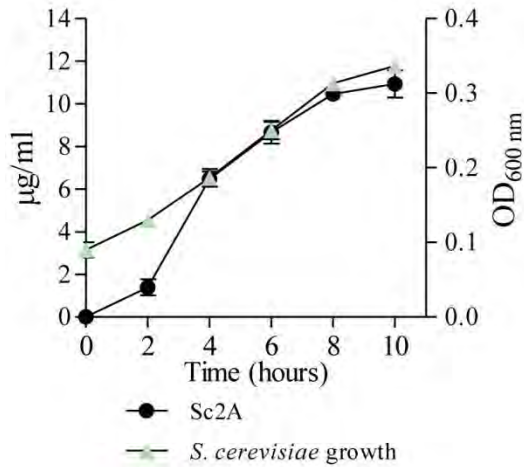


Figura 8.- Concentraciones de Sc2A en el cultivo a diferentes tiempos del crecimiento de *S. cerevisiae*. Las concentraciones de Sc2A se determinaron por HPLC, para lo cual se tomo como referencia el área bajo la curva de estándares (1, 5, 10, 50 y 100 µg/ml) y se elaboró una curva estándar.

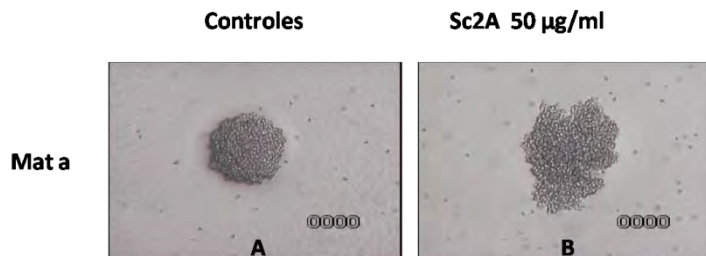


Figura 9.- Colonias de *S. cerevisiae* Σ 1278B Mat a de 24 hrs de crecimiento. Colonia control y colonia de células expuestas a 50 µg/ml de Sc2A.

Material Suplementario.

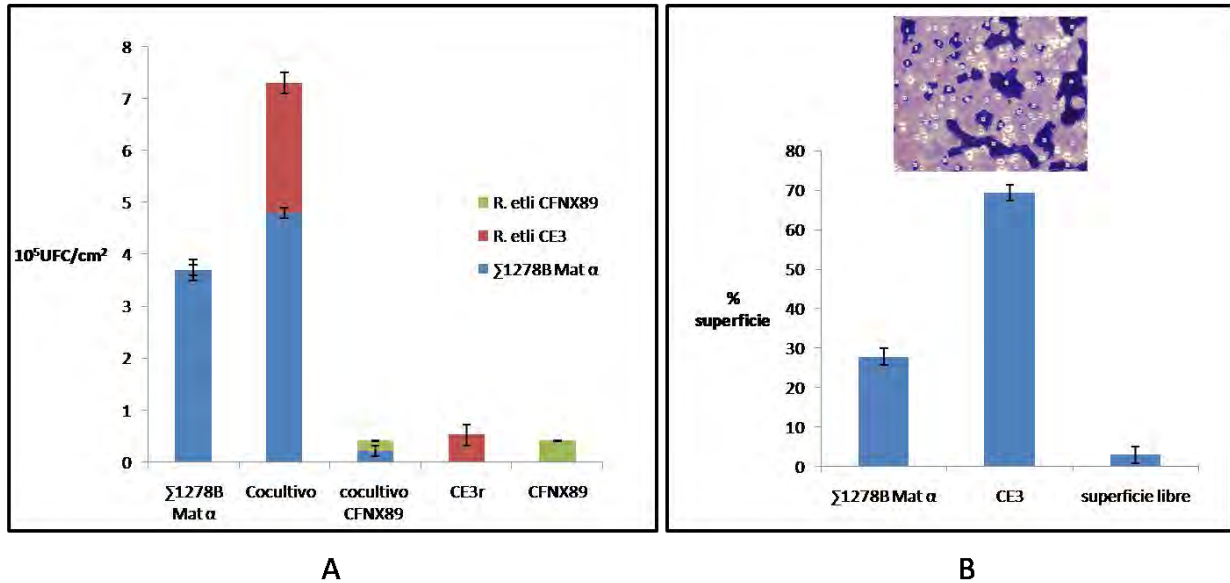


Figura suplementaria 1.- El bienestar de la comunidad *R. etli* CE3/*S. cerevisiae* se ve reflejado en una mayor densidad celular con respecto a los monocultivos. A) Unidades formadoras de colonias/cm² en biofilms mixtos y monocultivos a las 24 hrs. B) superficie ocupada por *R. etli* CE3 y *S. cerevisiae* en el biofilm mixto de 24 hrs. El área se calculo de 4 micrografías tomadas al azar y analizadas con el programa Scion Imagen. La micrografía es representativa del biofilm mixto. Tinción con cristal violeta al 1 %, los agregados de levadura se indican (parches azul oscuro), la superficie ocupada por *R. etli* esta en color purpura y la superficie libre de células corresponde a las zonas blancas.

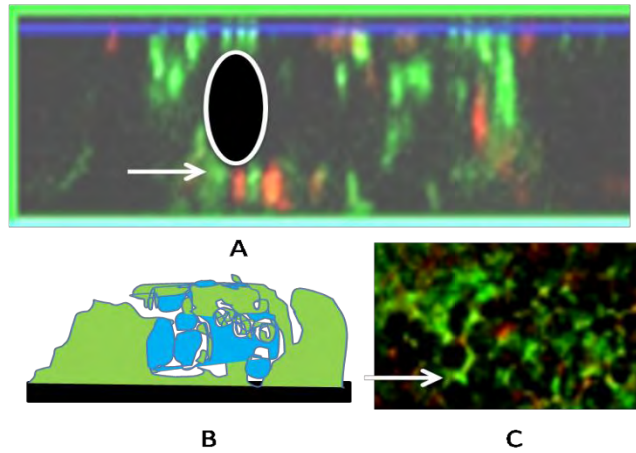


Figura suplementaria 2.- A) Proyección del biofilm mixto, el círculo representa una célula de levadura que esta adherida sobre células de *R. etli* (indicadas con la flecha). B) representación esquemática de (A), en azul se presentan los agregados de levadura y en verde las bacterias. En C) la flecha señala células de *R. etli* ubicadas entre las levaduras.

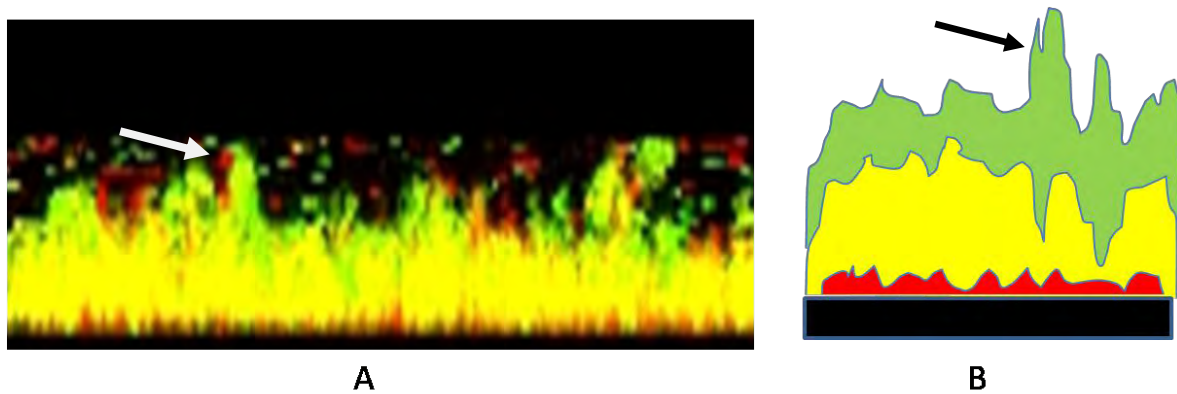


Figura Suplementaria 3.- A) Imagen de un corte transversal del biofilm maduro (96 hrs) de *R. etli* CE3. B) Representación esquemática de la imagen A). En rojo se representa el estrato compuesto por células muertas, en amarillo la población mixta de células viables y muertas. En verde el estrato dominado por células viables. La flecha indica los pilares formados por las células viables. En este tiempo, en el biofilm de *R. etli* pueden distinguirse tres estratos, en la base del biofilm una capa de células muertas seguida por una población mixta de células vivas y muertas. En el estrato superior todas las células son viables y forman pilares (ver figura 2). En este tiempo el biofilm está maduro y tiene un grosor de $\sim 9 \mu\text{m}$. Las micrografías se obtuvieron mediante microscopia laser con focal. Las células se tiñeron con el Kit LIVE/DEAD BacLight. En verde aparecen las células vivas y en rojo las células muertas.

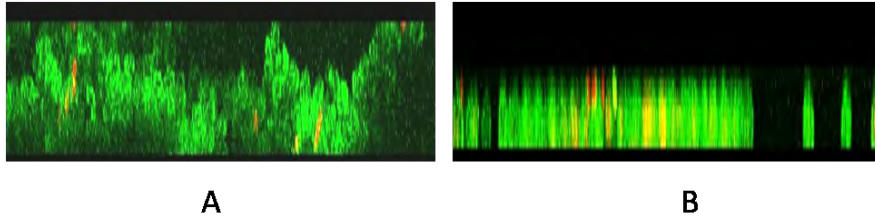


Figura Suplementaria 4.- Perfiles del biofilm de *S. cerevisiae*. A las 10 hrs levadura forma un biofilm con un grosor de $\sim 10 \mu\text{m}$, constituido por parches de agregados de 2 a 3 células de altura (A). Contrario a lo anterior, el biofilm a las 96 h en disgregación, tiene un grosor de $4 \mu\text{m}$ y los parches son monocapas (B). Las micrografías se obtuvieron mediante microscopía laser con focal. Las células se tiñeron con el Kit LIVE/DEAD BacLight. En verde aparecen las células vivas y en rojo las células muertas.

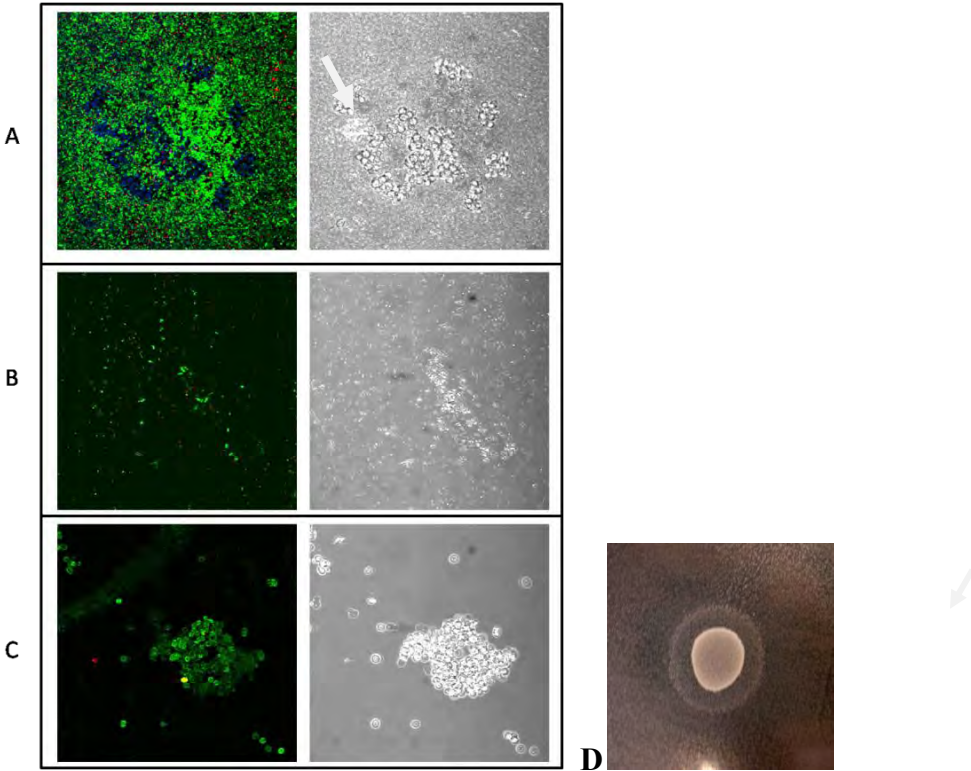


Figura Suplementaria 5.- Características del biofilm mixto y mono-específicos de 24 hrs. **A)**, Biofilm mixto de *S. cerevisiae* Σ 1278B Mat α -*R. etli* CE3. **B)**, Biofilm de *R. etli* CE3 en monocultivo. **C)** Biofilm de *S. cerevisiae* Σ 1278B Mat α en monocultivo. Las imágenes de fluorescencia se presentan en la primera columna y en la segunda columna se muestra el mismo campo en contraste de fases. Las micrografías se obtuvieron mediante microscopía láser confocal. Las células se tiñeron con el Kit LIVE/DEAD BacLigth. En verde aparecen las células vivas y en rojo las células muertas. La flecha señala los agregados de células de levadura. **D)** La imagen muestra abundante crecimiento bacteriano rodeando una colonia de levadura. El experimento se realizó en medio mínimo con 0.2% dextrosa.

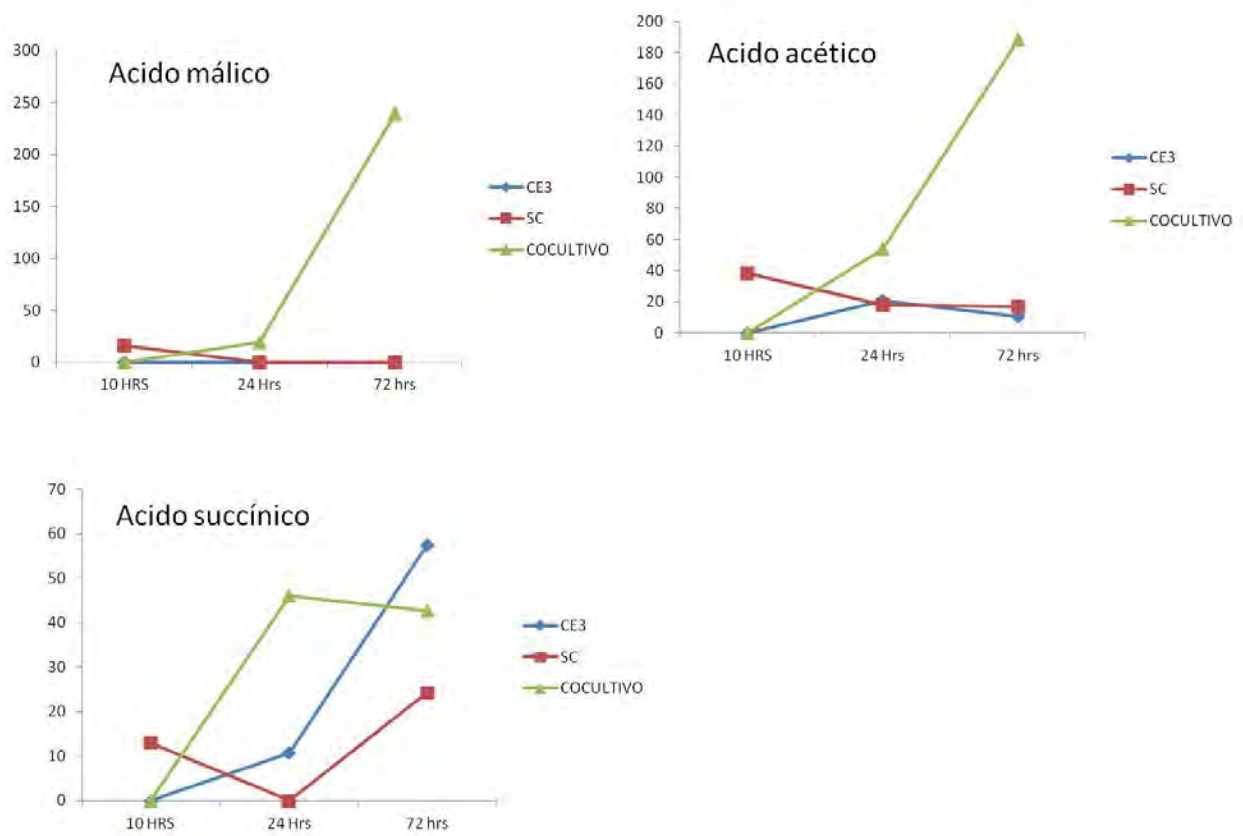


Figura Suplementaria 6. Concentraciones (nM/ml) de ácidos orgánicos en los sobrenadantes de monocultivos y cocultivos.

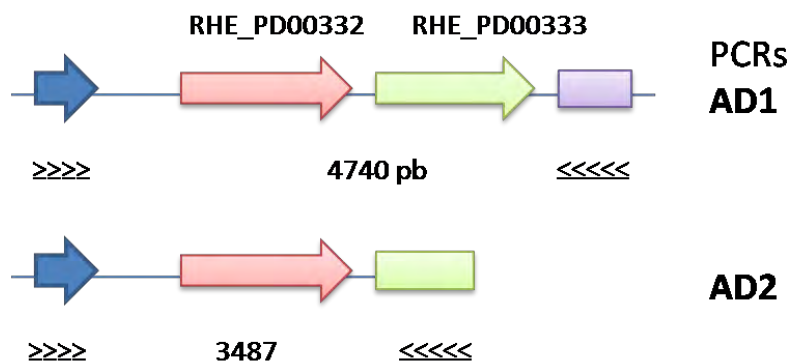


Figura Suplementaria 7.- Esquema que representa los productos de PCR que se utilizaron para clonar en el plásmido pCR TOPO-2.1 y posteriormente subclonarlos en el plásmido pBBR1MCS-3. Se indica el tamaño de los ampliaciones, AD1 4740pb y AD2 3487pb.

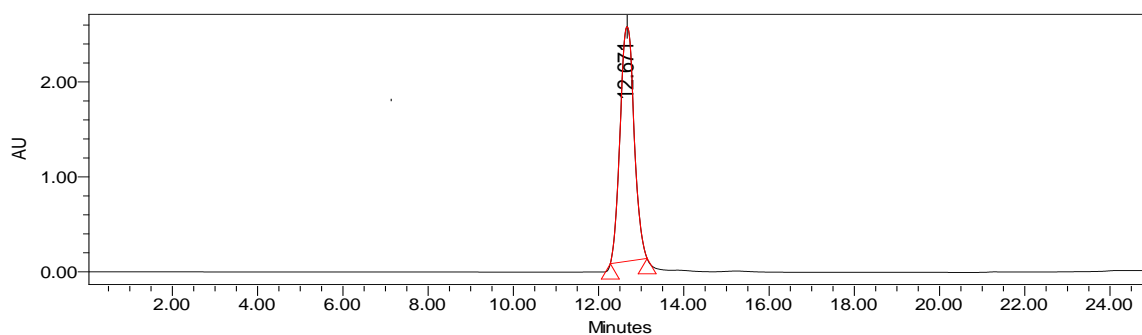


Figura Suplementaria 8. Cromatograma del compuesto puro denominado Sc2A

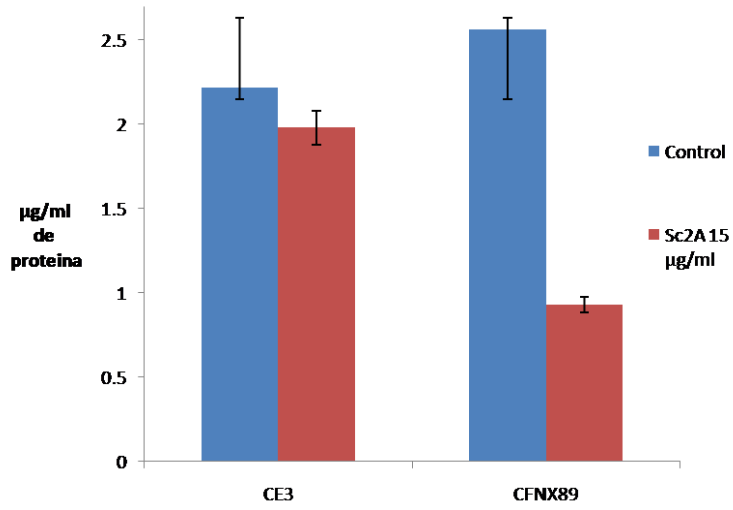


Figura Suplementaria 9.- A) Efecto de Sc2A 15µg/ml en el crecimiento de *R. etli* CE3 y *R. etli* pA⁻/pD⁻.

8. CONCLUSIONES GENERALES

Diversos estudios han documentado que los cambios ecológicos afectan a la evolución y que las dinámicas evolutivas pueden afectar a los procesos ecológicos (Yoshida *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2006; Post & Palkovacs, 2009; Schoener, 2011; Sanchez & Gore, 2013). A pesar del potencial que tiene la evolución para influir directamente en la ecología, no se conoce la importancia de la vía evolución-ecología en la persistencia de las interacciones y en la estabilidad de las comunidades (Thompson, 1999). Algunos estudios han mostrado que la evolución rápida afecta las interacciones interespecíficas y la estructura genotípica de las comunidades naturales (Whitham *et al.*, 2006; Thompson, 1998).

Aquí, nosotros mostramos que en una comunidad de dos especies de microorganismos que no tienen una historia de previa interacción, la retroalimentación entre procesos ecológicos (construcción del nicho) y procesos evolutivos (evolución rápida) juega una función fundamental en la emergencia y dinámicas de las interacciones entre las especies.

La teoría de la construcción del nicho explícitamente reconoce la habilidad de los organismos para modificar los atributos bióticos y abióticos de su ambiente, el potencial que tienen estos cambios para ser la causa de la evolución adaptativa en la comunidad (Laland *et al.*, 1999; Post & Palkovacs, 2009; Schoener, 2011). Nosotros demostramos que levadura tuvo un fuerte efecto en el ambiente y en consecuencia causó la evolución de la población de la bacteria, por lo tanto levadura tiene el potencial para la construcción del nicho. Así mismo, fuimos capaces de establecer las bases genéticas y fisiológicas de la adaptación de la bacteria al amensalismo y así proporcionamos un estado explícito de causalidad entre cambios ecológicos y dinámicas evolutivas en la interacción.

Harmon *et al.* (2009) mostraron que la radiación adaptativa tiene efectos considerables en la composición y abundancia de las especies en niveles tróficos bajos. Estas consecuencias después son reflejadas en cambios de características del ecosistema que a su vez puede afectar el curso de la radiación adaptativa. Aquí, nosotros observamos que la evolución adaptativa convirtió a la bacteria en un “ingeniero del ecosistema”, ya que las nuevas poblaciones modificaron el ambiente compitiendo por nutrientes y alcalinizando el medio de cultivo. Las actividades de

construcción del nicho por la bacteria causaron la pérdida de la viabilidad de levadura. Así, la diversificación evolutiva de la bacteria cambió la interacción de amensalismo a antagonismo.

Nuestros resultados muestran que la retroalimentación en la comunidad emerge de la construcción del nicho y de la habilidad de la bacteria para evolucionar en respuesta a la selección causada por los cambios en el ambiente. Así, las dinámicas eco-evolutivas tienen el potencial para transformar la estructura y función de las comunidades.

Ha sido demostrado que una población que es expuesta a un estrés puede adaptarse a través de la selección natural y así evitar la extinción (Bell & Collins, 2008). Este proceso de “rescate evolutivo” ha sido descrito para poblaciones de especies en cultivos puros (Bell & Gonzalez, 2011) pero no ha sido estudiado en las interacciones interespecíficas. Nuestro estudio demuestra por primera vez, para nuestro conocimiento que el rescate evolutivo, un rasgo eco-evolutivo de nuestro sistema, tiene el potencial para cambiar el curso de una interacción biológica y dar origen al surgimiento de un “ingeniero del ecosistema”.

A pesar de la abundancia y diversidad de las interacciones entre hongos y bacterias en la naturaleza (Azam & Malfatti, 2007) y el cuerpo humano (Wargo & Hogan, 2006), conocemos muy poco acerca de la contribución de los procesos ecológicos y evolutivos que delinear a estas interacciones y su importancia para la salud humana (Robinson *et al.*, 2010). Nuestros resultados muestran que un enfoque eco-evolutivo puede proporcionar un entendimiento profundo de las interacciones huésped-microbio, incluyendo la dinámica de la enfermedad, y del ensamble de las comunidades biológicas en general.

9. PERSPECTIVAS

Las redes ecológicas están constituidas por una amplia diversidad de interacciones interespecíficas. Para mejorar nuestro entendimiento de las interacciones biológicas, las siguientes cuestiones deberán ser abordadas en un futuro: ¿Cómo influye el rescate evolutivo en las interacciones interespecíficas?, ¿Qué procesos afectan a las dinámicas eco-evolutivas en las interacciones interespecíficas?, ¿Cómo las interacciones biológicas generan patrones ecológicos?, ¿Cómo evolucionan y coevolucionan los patrones simbióticos?

Muchas de estas cuestiones son difíciles de abordar estudiando las interacciones naturales. Nuestro sistema *S. cerevisiae*-*R. etli* ha mostrado tener características esenciales de las interacciones naturales y por lo tanto puede ser un sistema útil para responder las cuestiones antes planteadas.

Una perspectiva importante es lograr una visión más realista de las dinámicas eco-evolutivas de la mayoría de las comunidades naturales. Para lograr esto, necesitamos conocer como las propiedades de una comunidad de dos especies son alteradas por la presencia de una especie adicional. Fussman y colaboradores (2007) proponen que los probables efectos en una comunidad de dos especies por la adición de una o más especies son: 1) los efectos que pueden tener las dinámicas de población de otra especie en la trayectoria evolutiva de un par focal; y 2) la evolución mutua de características relacionadas a la interacción en tres o más especies.

Cuestiones particulares se derivan del análisis de los efectos fisiológico del ácido orótico en *R. etli*. Se sabe que el ácido orótico promueve el crecimiento de varias especies bacterianas (Chattaway, 1944). Sin embargo, nosotros encontramos que *R. etli* es particularmente sensible a esta molécula. Considerando lo anterior, surgen las siguientes preguntas: ¿Por qué *R. etli* es sensible al desbalance purinas/pirimidinas ocasionada por el ácido orótico?, ¿Tiene el ácido orótico un papel en la interacción *Phaseolus vulgaris*-*R. etli*?

10. REFERENCIAS

Abrams PA, Matsuda H. (1997). Fitness minimization and dynamic instability as a consequence of predator–prey coevolution, *Evol. Ecol* 11: 1–20.

Blount ZD, Borland CZ, Lenski RE. (2008). Historical contingency and the evolution of a key innovation in an experimental population of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 7899–7906.

Bolter CJ, Jongsma MA. (1995). Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *J Insect Physiol* 41: 1071–1078.

Boulding EG, Hay T. (2001). Genetic and demographic parameters determining population persistence after a discrete change in the environment. *Heredity* 86: 313–324.

- Bouma JE, Lenski RE. (1988). Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature* 335: 351–352.
- Brodie E, Brodie E. (1991). Evolutionary response of predators to dangerous prey—reduction of toxicity of newts and resistance of garter snakes in island populations. *Evolution* 45: 221–224.
- Burger R, Krall C. (2004). Quantitative-genetic models and changing environments. In *Evolutionary conservation biology* (eds R Ferriere, U Dieckmann, D Couvet), pp. 171–187. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Burger R, Lynch M. (1995). Evolution and extinction in a changing environment: a quantitative-genetic analysis. *Evolution* 49: 151–163.
- Callaway R, Cipollini D, Barto K, Thelen G, Hallett S, Prati D, Stinson K, Klironomos J (2008). Novel weapons: invasive plant suppresses fungal mutualists in America but not in its native Europe. *Ecology* 89: 1043–1055.
- Champagnat N, Ferriere R, Meleard S. (2006). Unifying evolutionary dynamics: from individual stochastic processes to macroscopic models. *Theor Popul Biol* 69: 297–321.
- Chattaway FW. (1944). Growth stimulation of baeto-bacillus casei by pyrimidines. *Nature* 153: 250.
- Chitty D. (1952). Mortality among voles (*Microtus agrestis*) at Lake Vyrnwy, Montgomeryshire in 1936–1939. *Phil Trans R Soc Lond B* 236: 505–552.
- Chow S, Wilke C, Ofria C, Lenski R, Adami C. (2004). Adaptive radiation from resource competition in digital organisms. *Science* 305: 84–86.
- Clark MA, Moran NA, Baumann P, Wernegreen JJ. (2000). Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) and pitfalls of testing for phylogenetic congruence. *Evolution* 54: 517–525
- Crozat E, Philippe N, Lenski RE, Geiselman J, Schneider D. (2005). Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. XII. DNA topology as a key target of selection. *Genetics* 169: 523–532.
- Darwin C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection*. John Murray, London
- Darwin C. (1862). *On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilised by insects, and on the good effects of intercrossing*. John Murray, London
- Darwin C. (1859). *On the origin of species*. London, UK: John Murray. (Reprinted by Harvard University Press 1964).

- Dieckmann U, Ferriere R. (2004). Adaptive dynamics and evolving biodiversity. In *Evolutionary conservation biology* (eds R Ferriere, U Dieckmann, D Couvet), pp. 188–224. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Douglas AE. (1994). *Symbiotic Interactions*. Oxford: Oxford University Press.
- Ferriere R, Michod RE. (2011). Inclusive fitness in evolution. *Nature* 471: E6–E7.
- Fisher RA. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford, UK: Clarendon Press (reprinted by Dover, 1958).
- Frank SA. (1993). Coevolutionary genetics of plants and pathogens. *Evol Ecol* 7: 45–75.
- Fussmann GF, Loreau M, Abrams PA. (2007). Ecoevolutionary dynamics of communities and ecosystems. *Funct Ecol* 21: 465–477.
- Gage DJ, Margolin W, (2000). Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr Opin Microbiol* 3: 613.
- Gómez JM, Verdu M, Perfectti F. (2010). Ecological interactions are evolutionarily conserved across the entire tree of life. *Nature* 465: 918–921.
- Gomulkiewicz R, Holt RD. (1995). When does evolution by natural selection prevent extinction? *Evolution* 49: 201–207.
- Gonzalez A, Ronce O, Ferriere R, Hochberg M. (2012). Evolutionary rescue: an emerging focus at the intersection between ecology and evolution. *Phil Trans R Soc B* 368: 20120404.
- Gould SJ, Lewontin RC. (1979). The spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 205: 581–598.
- Hafner MS, Nadler SA. (1988). Phylogenetic trees support the coevolution of parasites and their hosts. *Nature* 332: 258–259.
- Hairston NGJ, Ellner SP, Geber MA, Yoshida T, Fox JA. (2005). Rapid evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. *Ecol Lett* 8: 1114–27.
- Haldane JBS. (1932). *The causes of evolution*. London, UK: Harper.
- Hansen SK, Rainey PB, Haagensen JAJ, Molin S. (2007). Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature* 445: 533–536.
- Harcombe W. (2010). Novel cooperation experimentally evolved between species. *Evolution* 64: 2166–2172.

- Heino M, Metz JAJ, Kaitala V. (1998). The enigma of frequency-dependent selection. *Trends Ecol Evol* 13: 367–370.
- Hendry AP, Kinnison MT. (1999). Perspective: the pace of modern life: measuring rates of contemporary microevolution. *Evolution* 53: 1637–53.
- Hillesland KL, Stahl DA. (2010). Rapid evolution of stability and productivity at the origin of a microbial mutualism. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 2124–2129.
- Itino T, Davies S, Tada H, Hieda Y, Inoguchi M. (2001). Cospeciation of ants and plants. *Ecol Res* 16: 787–793.
- Jeon K, Jeon M. (1976). Endosymbiosis in amebas—recently established endosymbionts have become required cytoplasmic components. *J Cell Physiol* 89:337–344
- Laland KN, Odling-Smee FJ, Feldman MW. (1999). Evolutionary consequences of niche construction and their implications for ecology. *Proc Nat Acad Sci USA* 96: 10242–7.
- Lenski RE, Travisano M. (1994). Dynamics of adaptation and diversification: a 10,000-generation experiment with bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 6808–6814.
- Losos, JB, Warheit KI, Schoener TW. (1997). Adaptive differentiation following experimental island colonization in *Anolis* lizards. *Nature* 387: 70–73.
- MacLean R, Gudelj I. (2006). Resource competition and social conflict in experimental populations of yeast. *Nature* 441: 498–501.
- Maharjan R, Seeto S, Notley-McRobb L, Ferenci T. (2006). Clonal adaptive radiation in a constant environment. *Science* 313: 514–517.
- Metz JAJ, Nisbet RM, Geritz SAH. (1992). How should we define fitness for general ecological scenarios. *Trends Ecol Evol* 7: 198–202.
- Nakajima T, Sano A, Matsuoka H. (2009). Auto-/heterotrophic endosymbiosis evolves in a mature stage of ecosystem development in a microcosm composed of an alga, a bacterium and a ciliate. *BioSystems* 96: 127–135.
- Noda S *et al.* (2007). Cospeciation in the triplex symbiosis of termite gut protists (*Pseudotrichonympha spp.*), their hosts, and their bacterial endosymbionts. *Mol Ecol* 16: 1257–1266.
- Orr HA, Unckless RL. (2008). Population extinction and the genetics of adaptation. *Am Nat* 172: 160–169.

- Palmer TM, Stanton ML, Young TP, Goheen JR, Pringle RM, Karban R. (2008). Breakdown of an ant-plant mutualism follows the loss of large herbivores from an African savanna. *Science* 319: 192–195
- Pelletier F, Garant D, Hendry AP. (2009). Eco-evolutionary dynamics. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 1483–9.
- Pimentel D. (1968). Population regulation and genetic feedback. *Science* 159: 1432–1437.
- Post DM, Palkovacs EP. (2009). Eco-evolutionary feedbacks in community and ecosystem ecology: interactions between the ecological theatre and the evolutionary play. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 1629–40.
- Rand DA, Wilson HB, McGlade JM. (1994). Dynamics and evolution: evolutionarily stable attractors, invasion exponents and phenotype dynamics. *Phil Trans R Soc Lond B* 343: 261–283.
- Reznick, D.N. *et al.* (1997). Evaluation of the rate of evolution in natural populations of guppies (*Poecilia reticulata*), *Science* 275, 1934–1936
- Ronsted N, Weiblen G, Cook J, Salamin N, Machado C, Savolainen V (2005). 60 million years of co-divergence in the fig-wasp symbiosis. *Proc R Soc B Biol Sci* 272: 2593–2599.
- Rosenzweig RF, Sharp RR, Treves DS, Adams J. (1994). Microbial evolution in a simple unstructured environment: genetic differentiation in *Escherichia coli*. *Genetics* 137: 903–917.
- Rozen DE, Lenski RE. (2000). Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. VIII. Dynamics of a balanced polymorphism. *Am Nat* 155: 24–35.
- Sachs JL, Simms EL. (2006). Pathways to mutualism breakdown. *Trends Ecol Evol* 21: 585–592.
- Schluter D, McPhail JD. (1992). Ecological character displacement and speciation in sticklebacks. *Am Nat* 140: 85–108.
- Schoener TW. (2011). The Newest Synthesis: Understanding the Interplay of Evolutionary and Ecological Dynamics. *Science* 331: 426–429.
- Sinervo B, Lively CM. (1996). The Rock–Paper–Scissors Game and the evolution of alternative male strategies. *Nature* 380: 240–243.
- Susan A. Dudley and Schmitt J. (1996). Testing the Adaptive Plasticity Hypothesis: Density-Dependent Selection on Manipulated Stem Length in *Impatiens capensis*. *Am Nat* 147: 445–465.
- Thompson JN. (1988). Variation in Interspecific Interactions. *Annu Rev Ecol Syst* 19: 65.
- Thompson JM. (1998). Rapid evolution as an ecological process. *Trends Ecol Evol* 13: 329–332.

Travisano M, Mongold JA, Bennett AF, Lenski RE. (1995). Experimental tests of the roles of adaptation, chance, and history in evolution. *Science* 267: 87–90.

Treves DS, Manning S, Adams J. (1998). Repeated evolution of an acetate-crossfeeding polymorphism in long-term populations of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 15: 789–797.

Turelli M. (1994). Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. *Evolution* 48: 1500–1513.

Via S, Lande R. (1985). Genotype-environment interaction and the evolution of phenotypic plasticity. *Evolution* 39: 505-522.

Weinreich DM, Delaney NF, Depristo MA, Hartl DL. (2006). Darwinian evolution can follow only very few mutational paths to fitter proteins. *Science* 312: 111–114.

Whitlock MC, Burger R. (2004). Fixation of new mutations in small populations. In *Evolutionary conservation biology* (eds R Ferriere, U Dieckmann, D Couvet), pp. 155–170. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

ORIGINAL ARTICLE

Eco-evolutionary feedbacks drive species interactions

Andrés Andrade-Domínguez¹, Emmanuel Salazar¹, María del Carmen Vargas-Lagunas¹, Roberto Kolter² and Sergio Encarnación¹

¹Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México and

²Department of Microbiology and Immunobiology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA

In the biosphere, many species live in close proximity and can thus interact in many different ways. Such interactions are dynamic and fall along a continuum between antagonism and cooperation. Because interspecies interactions are the key to understanding biological communities, it is important to know how species interactions arise and evolve. Here, we show that the feedback between ecological and evolutionary processes has a fundamental role in the emergence and dynamics of species interaction. Using a two-species artificial community, we demonstrate that ecological processes and rapid evolution interact to influence the dynamics of the symbiosis between a eukaryote (*Saccharomyces cerevisiae*) and a bacterium (*Rhizobium etli*). The simplicity of our experimental design enables an explicit statement of causality. The niche-constructing activities of the fungus were the key ecological process: it allowed the establishment of a commensal relationship that switched to ammensalism and provided the selective conditions necessary for the adaptive evolution of the bacteria. In this latter state, the bacterial population radiates into more than five genotypes that vary with respect to nutrient transport, metabolic strategies and global regulation. Evolutionary diversification of the bacterial populations has strong effects on the community; the nature of interaction subsequently switches from ammensalism to antagonism where bacteria promote yeast extinction. Our results demonstrate the importance of the evolution-to-ecology pathway in the persistence of interactions and the stability of communities. Thus, eco-evolutionary dynamics have the potential to transform the structure and functioning of ecosystems. Our results suggest that these dynamics should be considered to improve our understanding of beneficial and detrimental host–microbe interactions.

The ISME Journal advance online publication, 5 December 2013; doi:10.1038/ismej.2013.208

Subject Category: Evolutionary genetics

Keywords: fungal–bacterial interactions; eco-evolutionary feedbacks; adaptive evolution; niche construction; *Saccharomyces cerevisiae*; *Rhizobium etli*

Introduction

In nature, species are bound together by a web of complex interactions that are central to the structure, composition and function of any community (Thompson, 1994). Such interactions are dynamic and fall along a continuum between antagonism and cooperation (Ewald, 1987; Hayashi, 2006; Relman, 2008; Sachs *et al.*, 2011). Despite the central importance of species interactions to the diversification and organization of life, we still know little about how these relations arise and evolve (Thompson, 1999). Many studies describing interspecies interactions have focused on how ecological processes, for example, environmental

changes, affect the nature of the interaction (Kim *et al.*, 2008; Seyedsayamdost *et al.*, 2011; Duffy *et al.*, 2012). For example, the nature and strength of the interactions between ants and certain plants depend upon environmental factors such as nutrient or light availability, herbivore pressure or relationships with other organisms (Palmer *et al.*, 2008). Other studies have shown how the evolutionary process can affect the nature of interspecies interactions (Yoshida *et al.*, 2003; Harmon *et al.*, 2009; Hillesland and Stahl, 2010; Gómez and Buckling, 2011; Lawrence *et al.*, 2012). Using two unrelated soil-inhabiting bacteria, Hansen *et al.* (2007) showed that simple mutations in the genome of one species caused it to adapt to the presence of the other, forming an intimate and specialized association. A recent analysis of the symbiotic interaction between a bacteria and a nematode demonstrated that a genetic change in the bacteria reversibly switched the interaction from mutualism to parasitism (Somvanshi *et al.*, 2012).

Correspondence: S Encarnación, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad s/n, Col. Chamilpa, Cuernavaca 62210, México.

E-mail: encarnac@ccg.unam.mx

Received 10 June 2013; revised 14 October 2013; accepted 18 October 2013

Eco-evolutionary theory suggests that ecological and evolutionary process often occur on similar time scales, and that they codetermine the dynamic behavior of ecological communities (Post and Palkovacs, 2009; Schoener, 2011). For example, in two-species community variation in antipredator defense among algal genotypes can strongly influence rotifer growth rates and densities, which feed back to influence gene frequencies in algal populations (Meyer *et al.*, 2006).

A recent study with a single species showed that feedback between population and evolutionary dynamics determines the fate of social microbial populations (Sanchez and Gore, 2013). In contrast, fewer studies on interspecific interactions include eco-evolutionary dynamics as one of the working hypotheses to know how species interactions arise and evolve, even though its potential importance is clear (Thompson, 1999; Post and Palkovacs, 2009; Schoener, 2011).

Artificial microbial communities constructed from species that have no known history of previous interaction provide a platform to address many important questions about the origin of natural interactions (Hansen *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2008; Hillesland and Stahl, 2010). Natural interactions, which have evolved over millions of years, have received the most attention and have been examined extensively, for example, the *Rhizobium*-legume symbioses. Here, we take a different vantage point by investigating what happens when two species with no known history of previous interaction meet for the first time. To this end, we use a two-species artificial community composed of a fungus (*Saccharomyces cerevisiae*) and a bacterium (*Rhizobium etli*). *S. cerevisiae* is a widely-studied eukaryote for which there are a large number of genomic tools that make it ideal for work in areas such as evolution and ecology of species interactions (Replansky *et al.*, 2008). *R. etli* is a nitrogen-fixing bacterium that has evolved to form intimate, intracellular associations with legumes (Denison, 2000; González *et al.*, 2003). This soil bacterium has been widely studied during its interaction with the plant and in pure cultures, but less is known about how this plant symbiont interacts with other microbial species in free life.

To study how species interactions arise and evolve, *R. etli* CE3 and *S. cerevisiae* (a common lab strain) were grown together in rich medium for 9 days under well-mixed culture conditions. Measurements of the fitness of each species in coculture and monoculture were used to determine the nature of the interaction throughout the incubation period. Coculturing the bacteria with ~4700 yeast mutants allowed us to establish a causal relationship between changes in the environment caused by yeast and its effect on the nature of the interaction. At the beginning of the interaction, yeast simultaneously secreted an inhibitor (orotic acid, OA) of bacterial growth and growth promoters

(C₄-dicarboxylates) that blocked the effect of the OA, and it allowed the establishment of a commensal relationship. When the growth promoters became depleted (ecological change), the interaction shifted from commensalism to ammensalism.

We conducted proteomic, genome-wide transcriptomic and biochemical analysis of the population of cells exposed to OA, and showed that the OA-sensitive phenotype is caused by an imbalance between purine and pyrimidine nucleotides. Interestingly, we found that during ammensalism OA-resistant (OA^R) bacterial variants arose that allowed bacterial growth, which modified the environment and created competition for nutrients with the yeast. Thus, the rapid evolution prevents extinction of the bacteria (evolutionary rescue) and switched the interaction from ammensalism to antagonism.

Here, we show for the first time, to our knowledge, how the metabolic perturbation of an essential pathway may be the cause of a rapid evolutionary response that consequently changes the course of a biological interaction. We provide experimental evidence that the interplay between ecological (niche construction and metabolic relationships between species) and evolutionary processes (adaptive evolution) has a fundamental role in the emergence and dynamics of species interaction.

Finally, our results show that the *R. etli*-*S. cerevisiae* community can be a useful experimental model for discovering new evolutionary and physiological aspects of fungi and bacteria that cannot be found in pure culture or in the interaction with their natural partners.

Materials and methods

Strains, plasmids and culture conditions

The yeast, bacterial strains and plasmids used in the study are listed in Supplementary Table S1. *S. cerevisiae* was routinely grown in YPD (1% yeast extract, 2% bacto peptone and 2% dextrose) medium at 30 °C. *R. etli* was grown at 30 °C in PY (0.5% peptone, 0.3% yeast extract and 7 mM CaCl₂) medium. *Escherichia coli* was grown at 37 °C in Luria-Bertani medium. Antibiotics were supplied to each medium to maintain selection for plasmids or to select recombinant strains at the following concentrations: nalidixic acid (20 µg ml⁻¹), streptomycin (200 µg ml⁻¹), tetracycline (5–10 µg ml⁻¹), spectinomycin (200 µg ml⁻¹), kanamycin (30 µg ml⁻¹) and gentamicin (30 µg ml⁻¹). Triparental conjugations and site-directed mutagenesis of *R. etli* were performed as described previously (D'hooghe *et al.*, 1995). DNA preparation and recombinant DNA techniques were performed according to standard procedures (Sambrook and Russell, 2001).

Cocultures

R. etli CE3 and *S. cerevisiae* Σ1278h were cultured together in 150 ml flasks, each containing 50 ml of

PY-D medium (0.5% peptone, 0.3% yeast extract, 10 mM dextrose and 7 mM CaCl₂). We inoculated with $\sim 4 \times 10^6$ bacterial cells per ml and $\sim 5 \times 10^5$ yeast cells per ml in each flask at the start of an experiment. *R. etli* CE3 and yeast monocultures were grown in PY-D medium and PY-DOA¹⁰⁰ (PY-D medium with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ OA). Each flask was inoculated with $\sim 4 \times 10^6$ bacterial cells per ml. The cultures were incubated at 30 °C and shaken at 200 r.p.m. Samples of the cultures were periodically preserved at -80 °C in 20% glycerol. Each sample was tested for the presence of contamination by plating a sample (50 μl) on an Luria–Bertani agar plate.

Bacterial densities were measured by plating diluted cultures onto PY-DOA¹⁰⁰ agar plates and counting the number of colony-forming units (CFUs) after 72 h of incubation at 30 °C. The colonies of OA^R variants were larger in size and easily distinguished from the parental strain. Isolates were stored at -80 °C in 20% glycerol for use in subsequent assays.

Phenotypic analysis of OA^R isolates

We measured the total number of distinct phenotypes of OA^R variants based on a sample of 94 randomly chosen OA^R colonies from each sampling time. The bacterial isolates were arranged in 96-well microtiter plates containing 100 μl of PY-D medium with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ OA. The diversity of the population was determined by evaluating the growth of the clones in different culture media, assaying melanin production and performing a genetic complementation test.

The isolates were grown on PY-DOA plates for 48 h. Next, the cells were transferred to 96-well microtiter plates containing 100 μl of H₂O per well using a prong. Then, 100 μl of liquid medium per well was inoculated with 1 μl of the bacterial cell suspension and grown in a static incubator at 30 °C for 24 h. The growth yields were measured via optical density (OD) at 600 nm using a microplate reader (3550-UV, Bio-Rad). OD₆₀₀ data (mean \pm s.d.) were obtained from at least two independent cultures of each strain.

The growth of the isolates was evaluated in the following culture media:

PY-DOA¹⁰⁰, PY-D medium with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ OA; PY-DFOA⁵⁰, PY-D medium with 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 5-fluoroorotic acid; MM-S, minimal medium containing 10 mM succinate (Encarnación *et al.*, 1995); MM-S + Uridine, minimal medium containing 10 mM succinate supplemented with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ uridine; MM-D, minimal medium containing 10 mM dextrose and MM-D + Uridine, minimal medium containing 10 mM dextrose supplemented with 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ uridine.

Melanin production was assayed on PY-D plates containing 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$ tyrosine and 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$ CuSO₄, as described previously (Hawkins and

Johnston, 1988). The bacteria were incubated at 30 °C for 72 h, and the presence or absence of black pigment was monitored visually. The *rpoN1* mutant strains were unable to produce melanin, whereas no differences between the wild-type strains and *rpoNd* mutants were observed (Supplementary Figure S10). Strains that did not produce melanin were PCR screened for the presence of the tyrosinase gene (*mela*), which is plasmid encoded and can be lost (González *et al.*, 2003).

Genotyping assays to estimate allele frequencies

We constructed plasmids (Supplementary Table S1) containing each of the following wild-type genes: *dctA*, *dctB*, *dctB-dctD* operon, *rpoN1*, *pyrE* and *pyrF*. *R. etli* CE3 chromosomal DNA was used as the template for PCR to amplify each gene with its endogenous promoter (see the list of primers in Supplementary Table S2). The amplified genes were cloned into pBBR1MCS5. The resulting pAT plasmids were transformed into *E. coli* DH5 α . All plasmids were transferred to the OA^R isolates by triparental mating (D'hooghe *et al.*, 1995). The plasmids pAT-*dctA* and pAT-*dctB-dctD* were transferred to the *dct*-group. The resultant strains did not transport succinate, produce melanin or grow in MM-D.

The plasmid pAT-*rpoN1* was transferred to isolates that did not produce melanin and were unable to grow on MM-S and MM-S + uridine media. The uracil auxotrophs isolates were transformed with plasmids AT-*pyrE* and AT-*pyrF*. The growth of the transformed strains was evaluated in PY-DFOA, MM-S and MM-D media. As a control, the vector pBBR1MCS-5 was also transferred to the OA^R isolates, but no change in phenotype was observed. The complementation of OA^R isolates with a wild-type gene allowed them to growing MM-S and MM-D but not in PY-DFOA.

Gene sequencing

We sequenced the entirety of the *dctA*, *dctB*, *dctD*, *rpoN1*, *pyrE* and *pyrF* genes from the OA^R clones isolated in the evolution experiments. The PCR products were amplified using primer-F and primer-R (Supplementary Table S3). The primers in Supplementary Table S9 were used in separate Sanger sequencing reactions per template to cover the lengths of the genes.

Measurement of bacterial diversity

Diversity was measured by determining the characteristics of 94 OA^R isolates. Diversity was calculated as the complement of Simpson's index ($1 - \lambda$) (Simpson, 1949):

$$1 - \lambda = \left(1 - \sum_i p_i^2\right) \left(\frac{N}{N-1}\right)$$

where p_i is the proportion of the i phenotype and N is the total number of colonies sampled.

Fitness measures

For competitive fitness assays, the medium initially contained $\sim 4 \times 10^6$ CFU per ml of both ancestral *R. etli* CE3 and OAR variants ($\sim 1:1$) and additionally $\sim 5 \times 10^5$ CFU per ml of yeast when competing in the presence thereof. The mixed culture was allowed to grow for 48 h at 30 °C and was shaken at 200 r.p.m. After the desired number of daily growth cycles, a sample of the mixture was again diluted in Tween solution (0.01% Tween 80 and 10 mM MgSO₄) and plated onto PY-DOA¹⁰⁰ agar to estimate population densities of bacterial cells of each type. To estimate the yeast population density, the sample was centrifuged (4 min at 3000 × g), washed and deflocculated using 300 mM EDTA, diluted and plated onto YPD agar (*R. etli* does not grow on this medium) to determine the number of CFU (Smukalla *et al.*, 2008). The Malthusian parameter (Lenski *et al.*, 1991) m , which is the average rate of increase, was calculated for both competitors: $m = \ln(N_f/N_i)$, where N_f is the number of individuals present at the final count and N_i is the number of individuals present at the initial count. Relative fitness was calculated as the selection rate constant: $r_{ij} = m_i - m_j$, resulting in a fitness of zero when competing organisms are equally fit.

Statistical analysis

Analysis of variance and Tukey's Multiple Comparison Tests were used to identify significant differences between treatments of interest.

Yeast deletion screen

Yeast knock-out strains (YKO library, Open Biosystems, Huntsville, AL, USA) were tested against *R. etli* CE3 to identify the genes involved in OA production. The library contains ~ 4700 null mutations in nonessential genes. Individual deletion strains (4 μ l) were transferred from frozen stocks to YPD (containing 200 μ g ml⁻¹ G418) medium plates using a prong and were grown at 30 °C for 2 days. Following this, 96 mutants were spotted (the distance between strains was 1.5 cm) over 24 × 24 cm PY-D (25 mM dextrose) agar plates inoculated with $\sim 3 \times 10^7$ cells ml⁻¹ *R. etli* CE3. The yeast and bacteria were co-incubated at 30 °C for 24 h, and the presence or absence of an inhibition zone was monitored visually (Supplementary Figure S1). Furthermore, the mutants that did not promote bacterial growth within the inhibition zone were isolated (Figure 1d). We identified three strains that did not produce inhibition zones (Supplementary Figure S3B). These strains were then retested, and OA production was quantified by HPLC as described in Supplementary Materials and Methods.

Transcriptome analysis of *R. etli*

R. etli CE3 was grown overnight in PY medium. The cells were collected by centrifugation and washed twice with water. These cells were used to inoculate 100 ml MM-D medium in a 250-ml Erlenmeyer flask at an OD₆₀₀ of 0.2. After 4 h incubation at 30 °C with constant shaking (200 r.p.m.), the cultures were supplemented with 100 μ l of H₂O (negative control) or 50 μ g ml⁻¹ of OA. After 30 min incubation at 30 °C with constant shaking (200 r.p.m.), the cells were collected by centrifugation at 5520 × g for 5 min, flash-frozen and stored in liquid nitrogen. The total RNA was extracted using an RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. Microarray experiments were conducted using three independently isolated RNA preparations from independent cultures. Microarray preparation, synthesis of fluorescent cDNA probes, hybridization with *R. etli* CE3 cDNA microarray and signal analysis were strictly conducted as reported previously (Salazar *et al.*, 2010).

We used the mean Z-score of the three replicates to produce a preordered ranked gene list data set, which was then tested for enrichment by Gene Set Enrichment Analysis (GSEA v. 2.0, Broad Institute, Cambridge, MA, USA) (Subramanian *et al.*, 2005). Gene sets were generated and modified with biochemical pathway data publicly available from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; www.genome.jp/kegg).

To study the extent of the effects of OA on *R. etli* CE3, the transcriptome microarray data were first organized into biological process clusters according to the KEGG. We tested the KEGG gene sets of the *R. etli* organism microarray data for enrichment by GSEA. The overall results of the *R. etli* CE3 enrichment are depicted in Supplementary Table S8. Several gene sets were differentially enriched ($P < 0.05$, FDR < 0.25) in the *R. etli* CE3 under OA stress. Eleven gene sets were negatively enriched (repressed), and one was positively enriched (activated).

Results

Niche construction by yeast allows the establishment of a commensal relationship with the bacteria

The budding yeast *S. cerevisiae* (strain $\Sigma 1278h$ *ura3Δ*) and the nitrogen-fixing bacterium *R. etli* (strain CE3) are microorganisms that do not have a known history of previous interaction. In our experiments, we cultured the species together in rich medium with shaking for 9 days. The absolute fitness as measured by the average rate of population increase, or Malthusian parameter, was calculated for both species in the cocultures. To identify changes in the nature of their interactions, we analyzed the fitness of bacteria relative to yeast throughout the incubation period.

We found that the interaction was dynamic, switching from commensalism to ammensalism

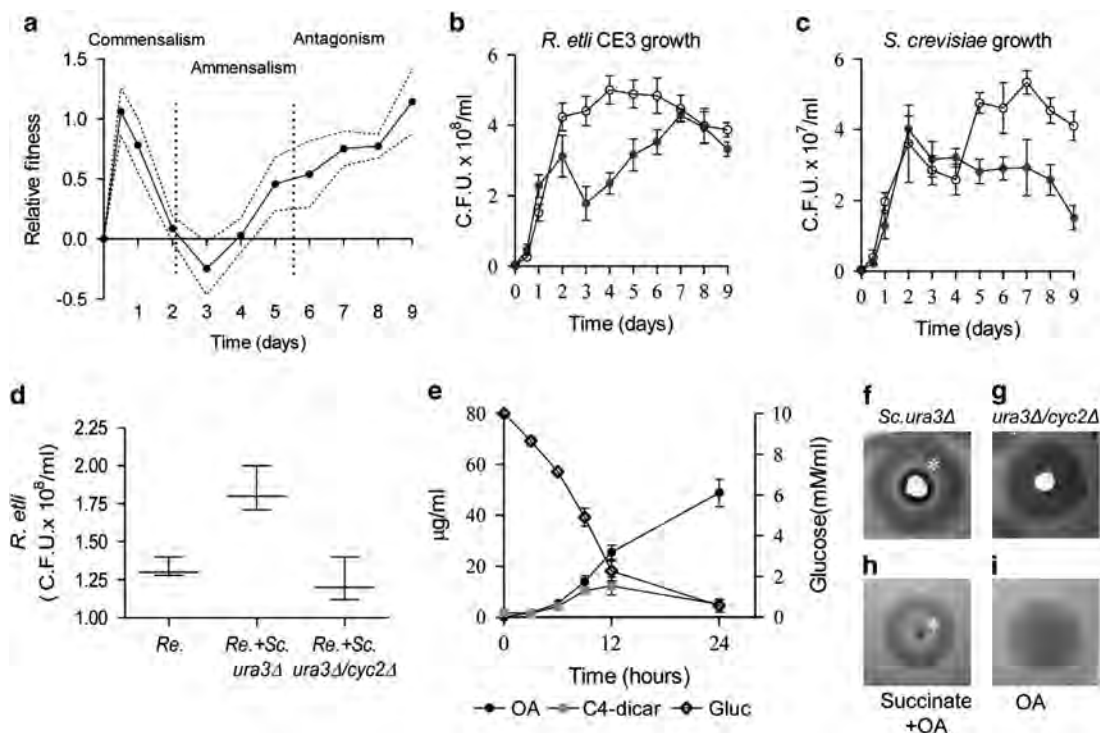


Figure 1 Temporal dynamics of the fungal–bacterial interaction and niche construction by yeast. (a) The fitness of *R. etli* CE3 relative to *S. cerevisiae* Σ 1278h *ura3A*. Fitness is given as the difference in Malthusian parameters (m). A fitness of zero indicates that the two species are equally fit. Dotted lines indicate \pm s.e.m. ($n=3$). (b, c) Individual growth curves of *R. etli* and *S. cerevisiae* in coculture (filled symbols) and pure culture (open symbols). (d–i) C_4 -dicarboxylate production by yeast is required for the establishment of commensalism. (d) Population density of *R. etli* at 24 h in monoculture (*Re.*), coculture with *S. cerevisiae ura3A* (*Re.+Sc.ura3A*) and coculture with the *S. cerevisiae cyc2* mutant (*Re.+Sc.ura3A/cyc2A*), in the BY4741 background. (e) The environmental changes in coculture through the course of the evolution experiment. Left y-axis: concentrations of OA and C_4 -dicarboxylates (plotted as the sum of succinate, fumarate and α -ketoglutarate). Right y-axis: concentrations of Glucose. (f, g) The experiments demonstrate the capacity of yeast strains to modify the environment and determine the community structure on solid media. (f) *R. etli* CE3 grow as a commensal organism inside the inhibition zone (asterisk) surrounding the *ura3A S. cerevisiae* colony. (g) *cyc2A/ura3A S. cerevisiae* cells, which do not accumulate C_4 -dicarboxylates, do not promote bacterial growth. (h, i) Experiments to mimic community structure generated by yeast strains. (h) OA and succinate ($50\ \mu\text{g}$ each) were placed together on the plate. Succinate promoted bacterial growth inside the inhibition zone (asterisk). (i) Bacterial growth inhibition by OA ($50\ \mu\text{g}$). All panels show the mean \pm s.e.m. ($n=3$).

and to antagonism (Figure 1a). In the early stages of the interaction, the presence of the yeast improved bacterial growth; a higher yield was observed compared with their growth in pure culture (Figure 1b). In contrast, during the first four days of coculture the bacterium does not reduce or promote the growth of the yeast, that is, yeast growth is similar in the cocultures and pure cultures (Figure 1c). The capacity of yeast to increase bacterial growth yield was associated with the production of C_4 -carboxylates, because respiration-deficient yeast that excreted low quantities of C_4 -carboxylates (Dibrov *et al.*, 1997) were less efficient at promoting bacterial growth (Figures 1d, and g, Supplementary Figure S2). At this stage, the relationship between these two species approximated that of a commensal partner (*R. etli*) and a host (*S. cerevisiae*). Thus, the niche-constructing activities of yeast were the key ecological process that allowed the establishment of a commensal relationship.

An ecological change transforms the interaction from commensalism to ammensalism

After 24 h of coculture, environmental changes shifted the interaction from commensalism to ammensalism (Figure 1a). Ammensalism is the ecological interaction in which an individual harms other without obtaining any benefit. We found that this change in the interaction was caused by a metabolite excreted by the yeast that inhibits the growth of the bacterium (Figures 1f–i, Supplementary Figure S1). To confirm this, we isolated the bacterial growth inhibitor (we designated it P Σ A) from *S. cerevisiae* Σ 1278h *ura3A* culture supernatants (see Supplementary Methods, Supplementary Figure S1D). The identity of P Σ A was confirmed by chromatographic and analytical methods, such as infrared spectroscopy, mass spectrometry, ^1H NMR, ^{13}C NMR and gHSQC. Infrared spectroscopy data (see Supplementary Methods and Supplementary Table S4) and the mass spectrum of P Σ A were identical (Supplementary Figure S3) to the standard OA spectrum.

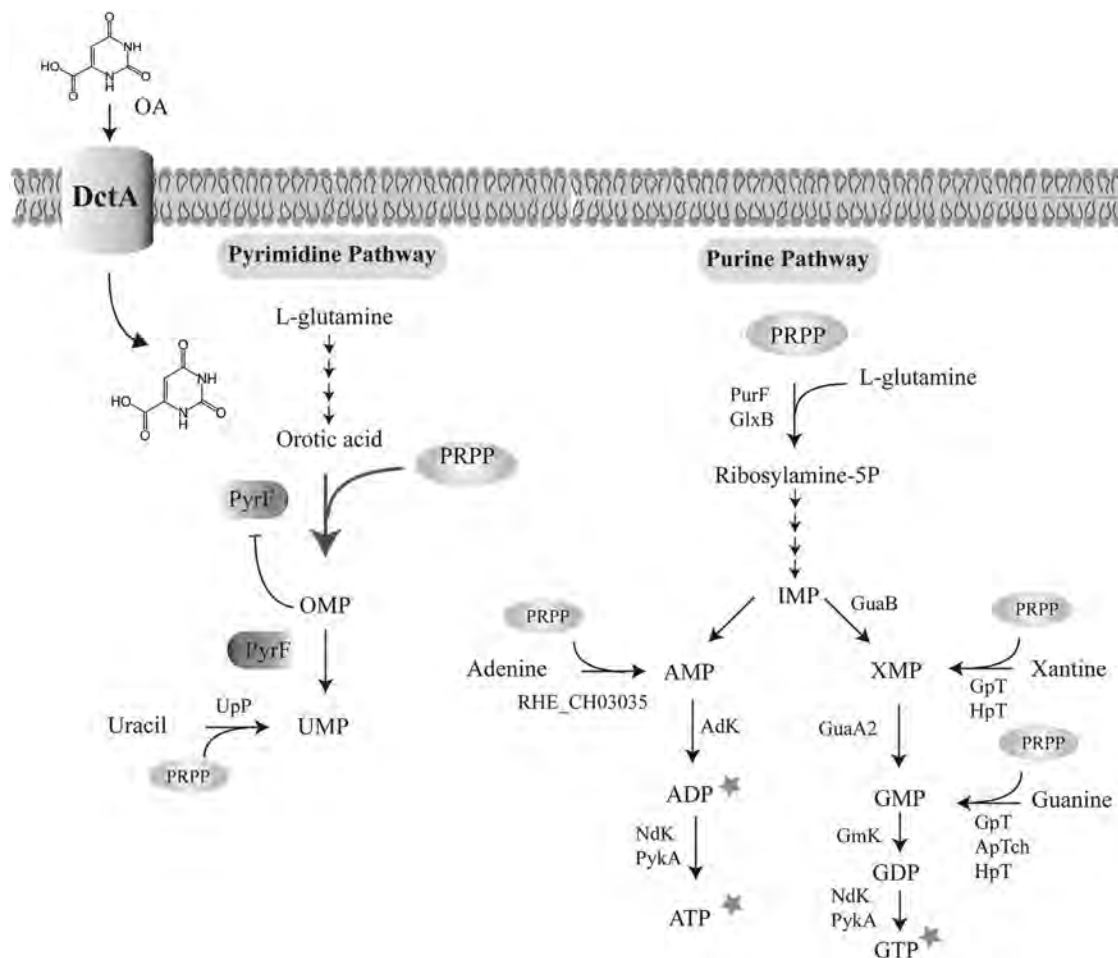


Figure 2 A proposed mechanism for the inhibitory effect of OA on the growth of *R. etli* CE3. OA is transported into cells by DctA permease (Reid and Poole, 1998; Yurgel and Kahn, 2005). Inside the cell, OA causes an increase in the rate of *de novo* pyrimidine synthesis at the orotate phosphoribosyl transferase (PyrE) step (thick arrow). Because this step consumes PRPP (5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate), we propose that the intracellular level of this metabolite was diminished by the exogenously supplied OA and caused retardation of the *de novo* purine synthesis. This notion is supported by the reversal of the inhibitory effect of OA by the simultaneous addition of purine derivatives (stars). We found that mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity (*PyrE*) did not consume PRPP and were not affected by OA (Supplementary Figure S5). Furthermore, mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity (*PyrF*) were OA-resistant (Supplementary Figure S5). Our hypothesis is that *pyrF* mutants accumulate orotidine-5'-phosphate (OMP) and that this metabolite inhibits the activity of *PyrE* and therefore reduces the consumption of PRPP. The image shows the simplified purine and pyrimidine pathways and indicates the PRPP-requiring reactions. Only the intermediates relevant to this study are shown.

The complete structure of PΣA was solved by interpreting one- and two-dimensional NMR spectra (^1H and ^{13}C NMR and gHSQC; see Supplementary Methods and Supplementary Table S5). Furthermore, PΣA had biological activity identical to OA (Supplementary Figure S1D). OA is an intermediate in the uridine-5'-phosphate biosynthetic pathway. OA accumulates in the medium of our strain of yeast because it lacks the *URA3* gene, which encodes orotidine-5'-phosphate decarboxylase (Figure 1d and Supplementary Figure S1). Importantly, yeast mutants unable to synthesize OA did not inhibit the growth of the bacterium, indicating that OA was responsible for the inhibition observed in the interaction (Supplementary Figure S1B).

We found that OA at concentrations greater than $15\ \mu\text{g ml}^{-1}$ (\pm s.d. 3) inhibited the growth of the

bacterium. In the cocultures, OA reached inhibitory concentrations ($25.5\ \mu\text{g ml}^{-1}$, \pm s.d. 5) by 12 h, but its effect on the growth of the bacteria was observed only after 24 h and correlated with the decrease in the concentration of C_4 -dicarboxylates derived from glucose fermentation (Figure 1d). Previous reports have demonstrated that the production of C_4 -dicarboxylates by yeast increases over time and is dependent on the rate of glucose consumption (Romano and Kolter, 2005). We hypothesized that C_4 -dicarboxylates secreted by yeast blocked OA transport into the bacterium and allowed the bacteria to grow as commensals. We found that in liquid cultures, succinate, malate and fumarate blocked the effect of OA (Supplementary Figure S4A). Previous studies have shown that in *Sinorhizobium meliloti*, dicarboxylates compete with OA

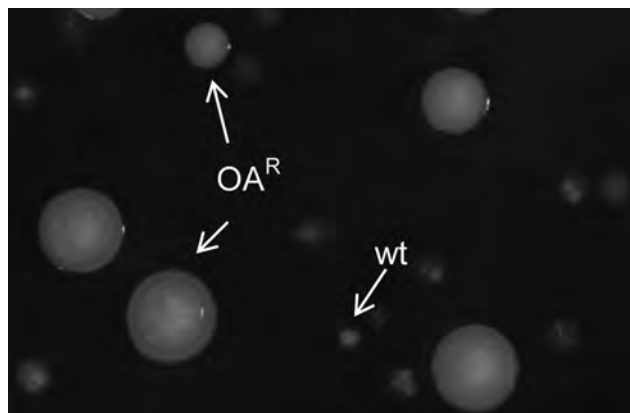


Figure 3 The characteristic phenotypes of the ancestral and the derived variants of *R. etli* CE3 on PYD¹⁰⁰ agar (96 h of growth). OAR cells develop large colonies and wild-type (wt) cells and translucent small colonies.

for the DctA permease and block OA transport (Yurgel and Kahn, 2005). Figure 1f shows that on culture plates, diffusion of C4-dicarboxylates secreted by yeast colonies blocked OA transport into the bacterium allowing it to grow within the inhibition zone. Using yeast knock-out strains (YKO library), we identified 120 yeast mutants that did not promote the establishment of a commensal relationship (Supplementary Table S6). The largest class of mutants were affected in mitochondrial functions and these mutants produced low amounts of organic acids (Supplementary Figure S2) (Dibrov *et al.*, 1997). Taken together, these results demonstrate that yeast has a strong impact on the community and therefore had the potential for niche construction (Laland *et al.*, 1999; Post and Palkovacs, 2009). The mechanism used by yeast for niche construction was the simultaneous secretion of bacterial growth promoters (C4-dicarboxylates from glucose fermentation) and a bacterial growth inhibitor (OA) (Figures 1e–i and Supplementary Figure S1). Thus, the interaction switched from commensalism to ammensalism when glucose was consumed and the concentration of C4-dicarboxylates decreased to levels below those required to block the transport of OA (Figure 1e).

The OA-sensitive phenotype is caused by an imbalance between purine and pyrimidine nucleotides

When individuals of two species interact, they can adjust their phenotypes in response to their respective partner, be they antagonists or mutualists. Single genotypes can change their chemistry, physiology, development, morphology or behavior in response to environmental cues (Hansen *et al.*, 2007; Seyedsayamdost *et al.*, 2011; Lawrence *et al.*, 2012; Somvanshi *et al.*, 2012). Here, we analyze the physiological changes of the bacteria caused by

the factor (OA) that changed the interaction from commensalism to ammensalism.

Growth inhibition of *R. etli* and other organisms by exogenous OA has not been previously reported. We conducted experiments to determine the possible mechanism by which OA exerts its growth-inhibitory effect on *R. etli* CE3. We conducted proteomic and genome-wide transcriptomic analysis of population of cells exposed to OA.

The results of the transcriptome analysis indicated that cells exposed to OA displayed considerable differences in gene expression compared with nonexposed cells (Supplementary Table S7 and S8). The observed changes fall into several broad categories. First, the decreased expression of genes involved in protein synthesis (including ribosomal genes), replication and energy production indicates that the cells arrest or at least slow their growth, which agrees with the observed growth arrest induced by OA (Supplementary Figure S4). The lack of growth might be associated with the limited availability of purines, as indicated by an upregulation of genes required for *de novo* purine nucleotide biosynthesis and genes involved in 5'-phosphoribosyl-1'-pyrophosphate (PRPP) biosynthesis. PRPP is an essential intermediate involved in many biosynthetic pathways, such as biosynthesis of purine nucleotides, pyrimidine nucleotides, NAD⁺, NADP⁺, histidine and tryptophan. PRPP is also consumed by purine and pyrimidine salvage pathways when purine or pyrimidine derivatives are added exogenously (Shimosaka *et al.*, 1984). PRPP and OA are substrates for the orotate phosphoribosyl transferase (OPTase), which catalyzes the reversible phosphoribosyl transfer from PRPP to OA, forming pyrophosphate and orotidine 5'-monophosphate (OMP) (Figure 2). The upregulation of a key enzyme (ribose-phosphate pyrophosphokinase, PrsA_{ch}) for PRPP synthesis suggests that cells exposed to OA suffer PRPP deprivation. We hypothesized that the PRPP pools were depleted as a result of an increase in the synthesis of OMP stimulated by exogenous OA. PRPP depletion would result in a marked decrease in purine synthesis, which would lead to an imbalance between purine and pyrimidine nucleotides (Shimosaka *et al.*, 1984), causing arrest of DNA synthesis (Sheikh *et al.*, 1993) and a lack of energetic nucleotides (ADP, ATP) (Reaves *et al.*, 2013).

To test if low purine ribonucleotide levels cause growth arrest in cells exposed to OA, we supplemented cultures with purines and analyzed the growth after treatment with OA (Supplementary Figure S4B). First, the addition of adenine and guanine did not reverse the growth inhibition caused by OA. These results were consistent with our proposal because purine nucleotide synthesis starting from adenine and guanine requires PRPP (Figure 2). Supplementation with guanine nucleotides or adenine nucleotides partially restored the growth of the bacteria. In

contrast, simultaneous supplementation with GTP and ATP completely blocks the effects of OA (Supplementary Figure S4B). These results suggest that the level of intracellular PRPP in the cells exposed to OA was not enough to support *de novo* purine synthesis in *R. etli* CE3.

The notion that PRPP pools were depleted by OPTase activity was also supported by isolating OA^R variants lacking OPTase activity (*pyrE*⁻) (Figure 3). Furthermore, mutants (*pyrF*⁻) lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase were resistant to OA (Supplementary Figure S5A). In addition, *pyrE* and *pyrF* mutants excrete high concentrations of OA and do not display growth defects (Supplementary Figure S6). We suggest that *pyrF* mutants accumulate OMP, which inhibits the OPTase activity; consequently, PRPP and OA are not consumed by this step (Figure 2).

Proteomic analysis revealed that OA affects the expression of the two main glutamine synthetases (GSI and GSII) of *R. etli*. The GSII (encoded by *glnII*)

was downregulated, and GSI was predominantly non-adenylylated (Supplementary Figure S7). We demonstrated that OA decreased GSI adenylation, thereby, increasing its specific activity. We propose that ATP depletion and an increased UTP may be the cause of the deadenylation of GSI induced by OA because ATP is required for the adenylation reaction and UTP stimulates GSI deadenylation via AT/PII-UMP (Jiang *et al.*, 1998). These results show that increasing GSI activity and downregulating *glnII* transcription, OA may alter ammonium assimilation in *R. etli*.

The niche construction and rapid evolution interact to alter the nature of the interaction

Eco-evolutionary feedbacks require that populations alter their environment (niche construction) and that those changes in the environment feed back to influence the subsequent evolution of the population (Post and Palkovacs, 2009). We show that

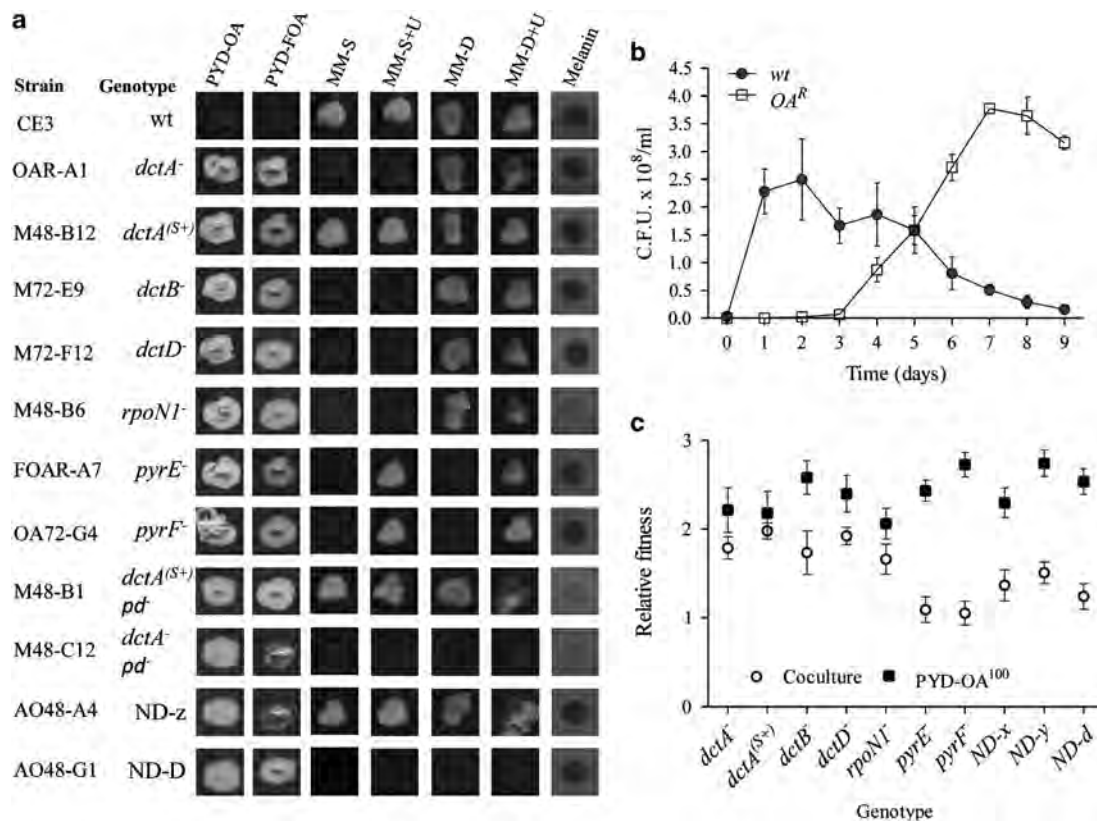


Figure 4 Adaptive radiation of *R. etli* CE3 in ammensal-enemy interaction. (a) The traits and genotypes of the representative OA^R variants that evolved in coculture. Each column shows the growth on different culture media and melanin production. Culture media are as follows: PYD-OA (complete medium with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ OA), PYD-FOA (complete medium with 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ FOA), MM-S (succinate minimal medium), MM-S + U (succinate minimal medium with uridine), MM-D (dextrose minimal medium) and MM-D + U (dextrose minimal medium with uridine). The genotypes were determined by Sanger sequencing (Table 1). The *dctA*^(S+) mutants retained some capacity to transport succinate but not OA and FOA. M48-B1 and M48-C12 strains lacked the symbiotic plasmid (*pd*). This plasmid contains the genes necessary for melanin synthesis; therefore, these strains do not produce the pigment. ND-z and ND-D indicate that the genetic change was not identified. (b) The rapid fixation of OA^R variants in coculture. The population dynamics of wt and OA^R cell populations. (c) The competitive fitness of OA^R variants. The fitness was determined relative to ancestral *R. etli* CE3 (initial ratio 1:1) in the presence of *S. cerevisiae* $\Sigma 1278\text{h}$ (open symbols) and in monoculture with 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ OA (filled symbols). Competitive fitness was determined in monoculture and coculture at 24 and 48 h, respectively. All panels show the mean \pm s.e.m. ($n = 3$).

during ammensalism bacterial growth was affected by the environmental changes generated by yeast (niche construction) (Figures 1e–g). Interestingly, we observed that the growth of the bacteria resumed after 3 days of coculture (Figure 1b), and yeast fitness then gradually declined (Figure 1c). To determine the cause of this change in the community, bacterial cells from 1- to 9-day-old cultures were grown on agar plates with OA (100 µg ml⁻¹). We determined that after 24 h in the cocultures, OA^R bacterial variants arose (Figures 3 and 4a). In cocultures, the OA^R population increased in frequency and displaced the ancestral type (Figure 4b).

The phenotype of the variants was heritable and was more competitive than the ancestral type in the presence of yeast and when cultured with OA (Figure 4c). To investigate the genetic changes underlying this adaptive evolution, the mutations responsible for the OA resistance of 28 isolates were determined (Table 1). Spontaneous mutations that led to loss-of-function in components of the dicarboxylate uptake system (*dctA*, *dctB*, *dctD*), sigma factor (*rpoN1*) and pyrimidine auxotrophs

(*pyrE* and *pyrF*) were identified (Figure 4a, Table 1). In rhizobia, C₄-dicarboxylates trigger the activation of the DctB/DctD two-component system, which enables the binding of RNA polymerase by the RpoN1 sigma factor and transcription of the *dctA* gene (Figure 5) (Reid and Poole, 1998). We demonstrated that inactivation individually of each of these genes prevents uptake of OA and FOA (5-fluoro-orotic acid, a toxic analog of OA) (Reid and Poole, 1998; Yurgel and Kahn, 2005). Thus, these mutated bacteria can grow even when exposed to high concentrations of these metabolites (Figure 4, Supplementary Figure S5A, Supplementary Table S9). These results show that the niche-constructing activities of yeast change the nature of the interaction and were sufficient to produce selection and subsequent evolution of the bacteria.

Interspecies competition for resources affects genotypic composition and reduces the diversity of bacterial populations

To understand the changes in the community generated by these evolutionary processes, we

Table 1 Mutations in evolved OA^R isolates from the fungal–bacterial community

Isolate	Gene	Mutation		
		Change in nucleotide sequence ^a	Change in amino-acid sequence	
OAR-A1	<i>DctA</i>	Δ375–527	In-frame deletion of 50 aa (Δ126–176)	
M48-B12		1145 T>G	382 M>R	
M48-A8		C insertion at 92	Truncation; retains first 31 native aa + 10 nonsense aa added	
M48-B8		T insertion at 88	Truncation; retains first 29 native aa + 12 nonsense aa added	
M72-F8		G insertion at 96	Truncation; retains first 33 native aa + 8 nonsense aa added	
M72-F10		G insertion at 92	Truncation; retains first 30 native aa + 11 nonsense aa added	
M72-G12		ΔT, 84	Truncation; retains first 94 native aa + 11 nonsense aa added	
M72-E9		ΔT, 380	Truncation; retains first 126 native aa + 103 nonsense aa added	
M72-F12		A insertion at 162	Truncation; retains first 54 native aa + 53 nonsense aa added	
M72-G1		ΔG, 627	Truncation; retains first 218 native aa + 20 nonsense aa added	
M72-G6	<i>DctB</i>	352 G>T	118V>F	
M72-H4		ΔT, 380	Truncation; retains first 218 native aa + 20 nonsense aa added	
M72-H10		352 G>T	118V>F	
M72-E3		<i>dctD</i>	G insertion at 246	Truncation; retains first 82 native aa + 18 nonsense aa added
M72-F12			ΔA, 227	Truncation; retains first 75 native aa + 3 nonsense aa added
M48-B6		<i>rpoN1</i>	ΔT, 1409	Truncation; retains first 469 native aa + 9 nonsense aa added
M72-E8			C insertion at 116	Truncation; retains first 190 native aa + 2 nonsense aa added
M72-E10		<i>pyrE</i>	ΔA, 1507	Truncation; retains first 502 native aa + 40 nonsense aa added
OA48-B11			ΔA, 1507	retains first 502 native aa + 40 nonsense aa added
FOAR-A6			G insertion at 130, 368 T>C	G insertion at 130, 368 T>C
FOAR-A7	Δ74,75			Truncation; retains first 25 native aa + 81 nonsense aa added
FOAR-C8	Δ74,75			Truncation; retains first 25 native aa + 81 nonsense aa added
FOAR-C11	Δ74,75			Truncation; retains first 25 native aa + 81 nonsense aa added
FOAR-C12	Δ74,75			Truncation; retains first 25 native aa + 81 nonsense aa added
FOAR-B6	<i>pyrF</i>			A insertion at 124
FOAR-A9			312 C>A	105 S>A
			313 T>G	107 L>R
		320 T>G	108 C>G	
FOAR-D5		Δ15	Truncation; retains first 4 native aa + 2 nonsense aa added	
OA72-G4		Δ248	Truncation; retains first 82 native aa + 3 nonsense aa added	
OA72-H7		A insertion at 39	Truncation; retains first 13 native aa + 20 nonsense aa added	

Abbreviations: aa, amino acids; OA^R, OA-resistant. ^aNumbering of sequences is from the first nucleotide in the start codon.

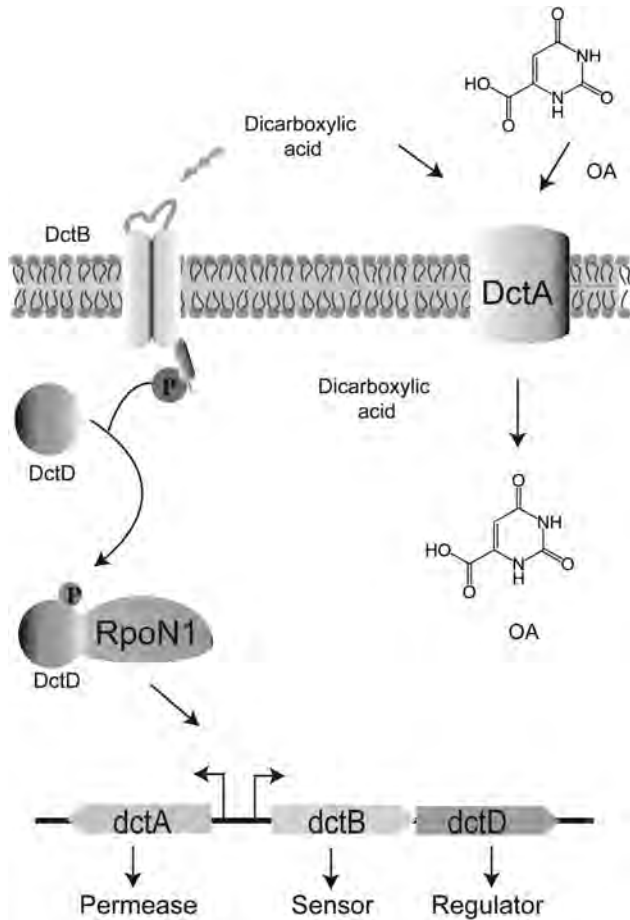


Figure 5 Transport of OA via the C₄-dicarboxylic transport (Dct) system. In *Rhizobium*, the transport of L-malate, fumarate and succinate occurs via the Dct system (Reid and Poole, 1998; Yurgel and Kahn, 2005). This system consists of three genes: *dctA*, which codes for the transport protein, and two divergently transcribed genes, *dctB* and *dctD*, which activate the transcription of *dctA* in response to the presence of dicarboxylates (Reid and Poole, 1998). DctB and DctD are well characterized as a two-component sensor-regulator pair. In free-living cultures, mutations in any of the three *dct* genes result in the loss of the capacity to transport and grow on C₄-dicarboxylates. Transcription from *dctA* is RpoN1 sigma factor-dependent (Meyer *et al.*, 2001), which binds to a site located 93-bp upstream from the *dctA* start codon in *R. leguminosarum* and a similar position in *R. etli* (Ronson *et al.*, 1987). In addition to dicarboxylates, DctA can transport compounds that are not dicarboxylates, such as OA and FOA, a toxic analog of OA (Yurgel and Kahn, 2005).

evaluated the genotypic diversity of OA^R variants through time. We found that bacterial populations evolving in coculture rapidly diversified into a variety of genotypes (Figure 4), resulting in high levels of sympatric diversity (Figure 6a). However, in the cocultures this diversity declined over time. In contrast, in pure culture with OA as a selective agent, the OA^R diversity did not change significantly over time (Figure 6a). Furthermore, we noted that the relative abundances of genotypes were significantly different with and without yeast. In the cocultures, the populations of pyrimidine auxotrophs (*pyrE* and *pyrF* mutants) and *rpoN1*

mutants declined rapidly and were displaced by *dct* mutants (Figure 6b).

To investigate the causes of the reduction of diversity in the cocultures, competitive fitness of OA^R variants was determined relative to a *dctA* mutant in coculture with yeast and in culture with OA. We found that the *pyrE* and *pyrF* mutants were less fit than the *dctA* mutants in the presence of yeast (competition environment) (Supplementary Figure S8). In contrast, this difference was not observed in medium supplemented with pyrimidines (Supplementary Figure S8). Given that the yeast strain used in this study was a pyrimidine auxotroph, we suggest that in the cocultures yeast consumed pyrimidines from the medium and, therefore, the populations of *pyrE* and *pyrF* mutants could not proliferate and compete with other OA^R variants. These results suggest that interspecies interactions may affect diversification within populations by opposing diversifying selection that arises from resource competition (Buckling and Rainey, 2002). Furthermore, these experiments illustrate how the niche construction affects the genetic composition of the community and the change of abundance of multiple populations.

Evolutionary diversification of the bacterial populations switched the interaction from ammensalism to antagonism

Previous studies have found that rapid evolution can affect ecosystem function (Harmon *et al.*, 2009). To investigate the possible effects of rapid evolution in the interaction, we monitored changes in yeast fitness throughout the cocultivation with *R. etli* wild type. We found that the yeast fitness declines (Figure 6c) when the population of OA^R variants reaches its maximum density (Figure 4). In contrast, the fitness of yeast did not decrease in pure culture compared with its fitness in coculture (Figure 6c). Furthermore, the yeast fitness was quickly affected in coculture with a *dctA* mutant (Figure 6c).

We found that alkaline pH and starvation were factors contributing to the loss of yeast viability in cocultures (Supplementary Figure S9). This is consistent with previous reports, which demonstrated that alkalization of the external environment affects the availability of different nutrients, such as phosphate, copper and iron (Serrano *et al.*, 2004). In addition, it has been demonstrated that iron deficiency increases oxidative stress, which significantly affects yeast lifespan (Almeida *et al.*, 2008).

Thus, evolutionary diversification of the bacterial populations switched the interaction from ammensalism to antagonism where bacteria promote yeast extinction (Figures 1 and 6c). Because rapid evolution allowed *R. etli* to significantly modify the environment, we suggest that adaptive evolution can give rise to an ecosystem engineer (Jones *et al.*, 1994).

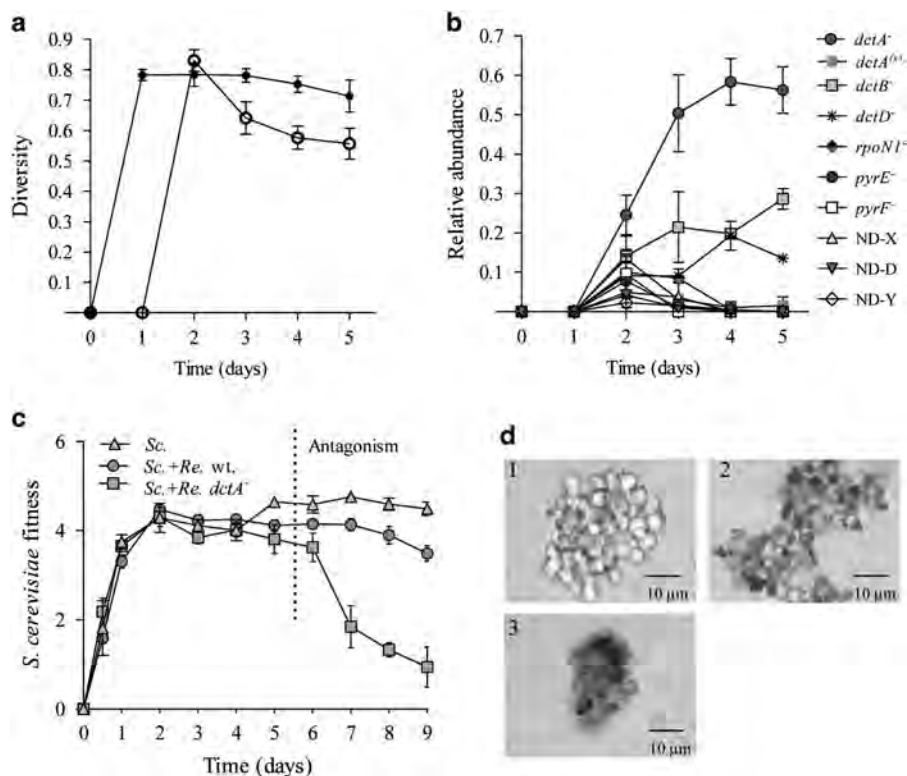


Figure 6 The ecological consequences of rapid adaptive evolution. (a) The diversity over time for OAR populations evolving with *S. cerevisiae* $\Sigma 1278h$ *ura3* mutant (open symbols) and in monoculture with $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ OA (filled symbols). Diversity was calculated as the complement of Simpson's index ($1 - \lambda$). (b) The relative abundance of different OAR^R genotypes along the symbiosis continuum. (c) Yeast fitness declined after the bacteria evolved. Yeast fitness in monoculture (*Sc.*), coculture with *R. etli* (*Sc. + Re.*) and coculture with *R. etli* *dctA*⁻ (*Sc. + Re. dctA*⁻). Fitness was measured using a growth rate or Malthusian parameter (*m*) based on colony counts. (d) The assay of yeast strain viability confirmed that yeast cells lost viability after 5 and 8 days of coculture with *R. etli* wt and *R. etli* *dctA*⁻, respectively. Cell viability was assayed using methylene blue after 8 days of culturing: stained cells were dead, and live cells remained white. Representative light microscopy images: (1) *S. cerevisiae* monoculture, (2) *S. cerevisiae*-*R. etli* coculture and (3) *S. cerevisiae*-*R. etli* *dctA*⁻ coculture. All panels show the mean \pm s.e.m. ($n = 3$).

Discussion

Many studies have documented that ecological change affects evolution and that evolutionary dynamics can also affect ecology (Yoshida *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2006; Post and Palkovacs, 2009; Schoener, 2011; Sanchez and Gore, 2013). Despite the potential for a directional influence of evolution on ecology, we still do not know the importance of the evolution-to-ecology pathway in the persistence of interactions and the stability of communities (Thompson, 1999). Studies have documented rapid evolutionary change that affects the interspecific interactions and genotypic structure within natural communities (Thompson, 1998; Whitham *et al.*, 2006).

Here, we show that in a two-species community of microorganisms that do not have a known history of previous interaction, the feedback between ecological (niche construction) and evolutionary processes (rapid evolution) has a fundamental role in the emergence and dynamics of species interaction. We further developed a highly simplified, conceptual model to delineate how the evolutionary dynamics emerge and alter the nature of fungus–bacterium

interaction (see Figure 7). First, at the beginning of the interaction, yeast simultaneously secreted an inhibitor of bacterial growth (OA) and growth promoters (C_4 -dicarboxylates) that blocked the effect of the inhibitor and allowed the establishment of a commensal relationship. When the growth promoters became depleted (ecological change), the interaction shifted from commensalism to ammensalism.

The niche construction theory explicitly recognizes the ability of organisms to shape the biotic and abiotic attributes of their environments and the potential for those changes to influence subsequent adaptive evolution (Laland *et al.*, 1999; Post and Palkovacs, 2009; Schoener, 2011). We demonstrated that the strong effect of yeast on the environment caused the subsequent evolution of the bacterial population, therefore, yeast had the potential for niche construction. We were able to establish the genetic and physiological basis of adaptations to ammensalism and thus provide an explicit statement of causality between ecological change and evolutionary dynamics.

A population that is exposed to a stress may adapt through natural selection and thereby avoid extinction (Bell and Collins, 2008). This process of

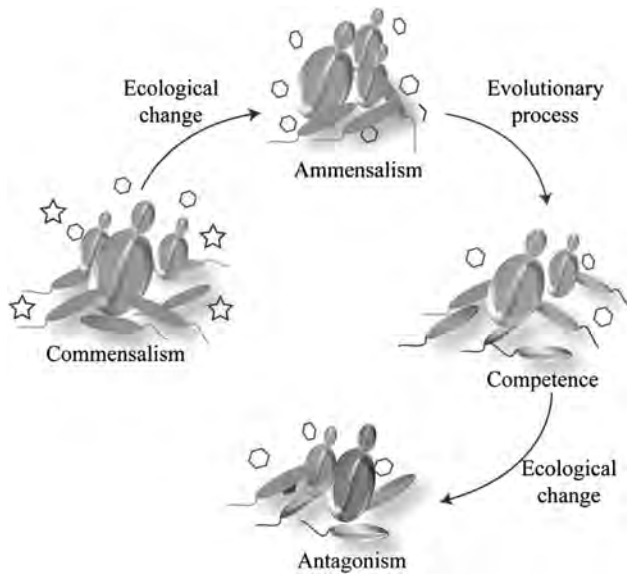


Figure 7 An abstract model delineates how ecological change and evolutionary processes drive the fungal–bacterial interaction. In our system, at the beginning of the interaction, yeast simultaneously secreted an inhibitor of bacterial growth (OA, hexagons) and growth promoters (C₄-dicarboxylates, stars) that blocked the effect of the inhibitor and it allowed the establishment of a commensal relationship. When the growth promoters became depleted (ecological change), the interaction shifted from commensalism to ammensalism. During ammensalism, the bacterial population radiated into more than five phenotypes, with multiple variations in nutrient transport (*dct* system mutations), global regulation (*rpoN1* mutations) and metabolic strategies (*pyrE* and *pyrF* mutations). The interaction between species affected the diversity and determined the phenotypic composition of the bacteria population. Adaptive evolution allowed the bacteria growth, which modified the environment and created competition for nutrients with the yeast. The ecological consequence of evolutionary diversification of the bacteria is a new change in the community: the interaction switch from ammensalism to antagonism.

‘evolutionary rescue’ has been described for single populations in the laboratory (Bell and Gonzalez, 2011) but has not been studied in species interactions. Our study demonstrates for the first time, to our knowledge that evolutionary rescue, an eco-evolutionary outcome of our system, has the potential to change the course of a biological interaction.

Harmon *et al.* (2009), showed that adaptive radiation has considerable effects on the composition and abundance of species at lower trophic levels. These consequences are then reflected in changes in ecosystem features that in turn are likely to affect the course of adaptive radiation. Here, we observed that adaptive evolution allowed the bacteria to grow and modify the environment, competing for nutrients and alkalizing the culture medium. These changes caused the loss of yeast viability (Figures 3c and d). Thus, evolutionary diversification of the bacterial populations switched the interaction from ammensalism to antagonism.

Our results show that the feedback in the community emerges from niche construction and from the ability of the bacteria to evolve in response to selection caused by changes in the environment. Thus, eco-evolutionary dynamics have the potential to transform the structure and functioning of the communities.

Despite the abundance and diversity of fungal–bacterial interactions in nature (Azam and Malfatti, 2007) and the human body (Wargo and Hogan, 2006), very little is known about the contribution of the ecological and evolutionary process underlying these interactions and their importance to human health (Robinson *et al.*, 2010). Our results show that eco-evolutionary approaches will provide a deeper understanding of host–microbial interactions, including disease dynamics, and of the structuring of ecological communities in general.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Prof Jaime Mora for his support and comments. We also thank Victoria Labastida (CIQ-UAEM) and Mariano Martínez (Instituto de Química-UNAM) for their support in solving the structure of orotic acid and Miguel Elizalde for technical assistance. Yeast knock-out strains were provided by Gabriel del Rio Guerra, and CE3 *rpoN* mutant strains by Ma de Lourdes Girard. We are grateful to the Biomedical Sciences PhD Program of the Universidad Nacional Autónoma de México. AAD was a recipient of a PhD Studentship from the CONACyT. Part of this work was supported by DGAPA-PAPIIT grant IN-206113. Finally, the authors appreciate the valuable comments and suggestions from two anonymous referees during the review process.

Accession number

The microarray data discussed in this work have been deposited in Gene Expression Omnibus (GEO). www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=nnibzqiwyueyacha&acc=GSE46013.

References

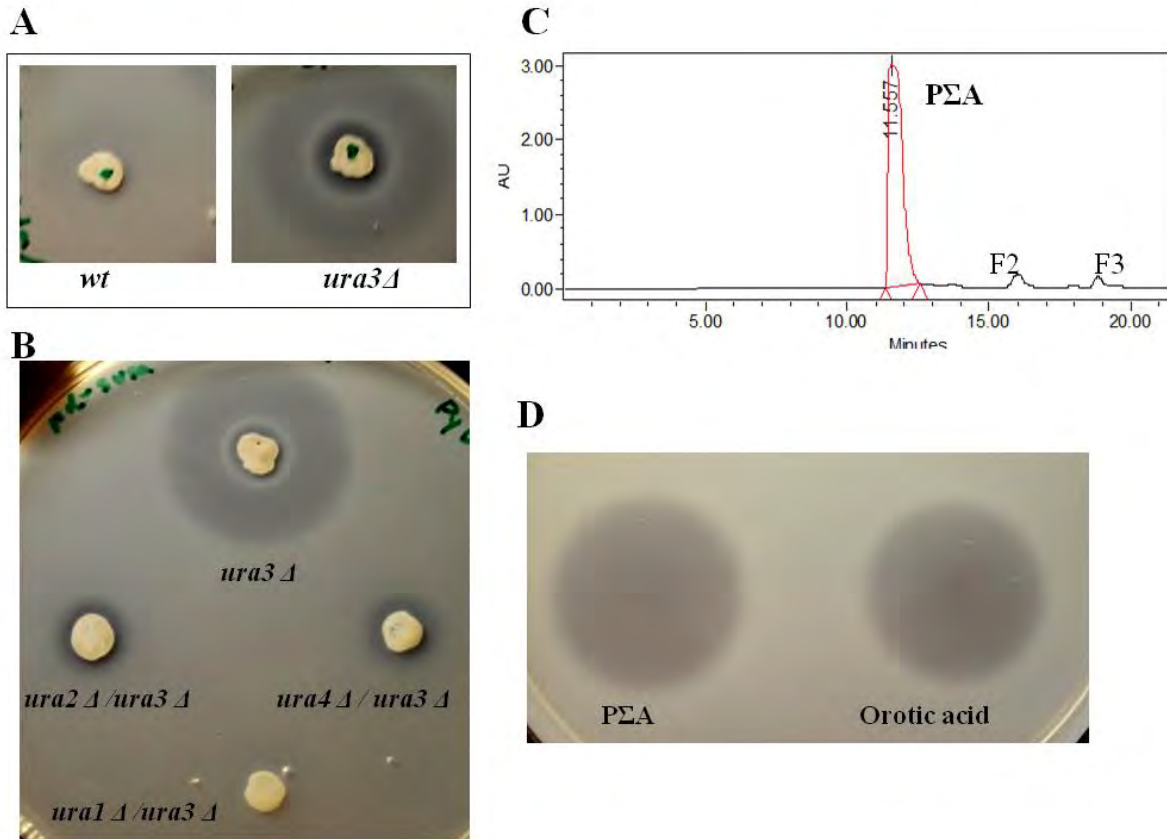
- Almeida T, Marques M, Mojzita D, Amorim MA, Silva RD, Almeida B *et al.* (2008). Isc1p plays a key role in hydrogen peroxide resistance and chronological lifespan through modulation of iron levels and apoptosis. *Mol Biol Cell* **19**: 865–876.
- Azam F, Malfatti F. (2007). Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Microbiol* **5**: 782–791.
- Bell G, Collins S. (2008). Adaptation, extinction and global change. *Evol Appl* **1**: 3–16.
- Bell G, Gonzalez A. (2011). Adaptation and evolutionary rescue in metapopulations experiencing environmental deterioration. *Science* **332**: 1327–1330.

- Buckling A, Rainey PB. (2002). The role of parasites in sympatric and allopatric host diversification. *Nature* **420**: 496–499.
- D'hooghe I, Michiels J, Vlassak K, Verreth C, Waelkens F, Vanderleyden J. (1995). Structural and functional analysis of the fixLJ genes of *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* CNPAF512. *Mol Gen Genet* **249**: 117–126.
- Denison RF. (2000). Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by Rhizobia. *Am Nat* **156**: 567–576.
- Dibrov E, Robinson KM, Lemire BD. (1997). The COQ5 gene encodes a yeast mitochondrial protein necessary for ubiquinone biosynthesis and the assembly of the respiratory chain. *J Biol Chem* **272**: 9175–9181.
- Duffy MA, Ochs JH, Penczykowski RM, Civitello DJ, Klausmeier CA, Hall SR. (2012). Ecological context influences epidemic size and parasite-driven evolution. *Science* **335**: 1636–1638.
- Encarnación S, Dunn M, Willms K, Mora J, Dunn M, Willms K *et al.* (1995). Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J Bacteriol* **177**: 3058–3066.
- Ewald PW. (1987). Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Ann N Y Acad Sci* **503**: 295–306.
- Gómez P, Buckling A. (2011). Bacteria-phage antagonistic coevolution in soil. *Science* **332**: 106–109.
- González V, Bustos P, Ramírez-Romero M, Medrano-Soto A, Salgado H, Hernández-González I *et al.* (2003). The mosaic structure of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 and its relation to other symbiotic genome compartments. *Genome Biol* **4**: R36.
- Hansen SK, Rainey PB, Haagenen JAJ, Molin S. (2007). Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature* **445**: 533–536.
- Harmon LJ, Matthews B, Des Roches S, Chase JM, Shurin JB, Schluter D. (2009). Evolutionary diversification in stickleback affects ecosystem functioning. *Nature* **458**: 1167–1170.
- Hawkins FK, Johnston AW. (1988). Transcription of a *Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli* gene needed for melanin synthesis is activated by *nifA* of *Rhizobium* and *Klebsiella pneumoniae*. *Mol Microbiol* **2**: 331–337.
- Hayashi T. (2006). Breaking the barrier between commensalism and pathogenicity. *Science* **313**: 772–773.
- Hillesland KL, Stahl DA. (2010). Rapid evolution of stability and productivity at the origin of a microbial mutualism. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 2124–2129.
- Jiang P, Peliska JA, Ninfa AJ. (1998). The regulation of *Escherichia coli* glutamine synthetase revisited: role of 2-ketoglutarate in the regulation of glutamine synthetase adenylylation state. *Biochemistry* **37**: 12802–12810.
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* **69**: 373–386.
- Kim HJ, Boedicker JQ, Choi JW, Ismagilov RF. (2008). Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 18188–18193.
- Laland KN, Odling-Smee FJ, Feldman MW. (1999). Evolutionary consequences of niche construction and their implications for ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 10242–10247.
- Lawrence D, Fiegna F, Behrends V, Bundy JG, Phillimore AB, Bell T *et al.* (2012). Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment. *PLoS Biol* **10**: e1001330.
- Lenski RE, Rose MR, Simpson SC, Tadler SC. (1991). Long-term experimental evolution in *Escherichia coli*. I. Adaptation and divergence during 2,000 generations. *Am Nat* **138**: 1315–1341.
- Meyer JR, Ellner SP, Hairston NG, Jones LE, Yoshida T. (2006). Prey evolution on the time scale of predator-prey dynamics revealed by allele-specific quantitative PCR. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 10690–10695.
- Meyer MG, Park S, Zeringue L, Staley M, McKinstry M, Kaufman RI *et al.* (2001). A dimeric two-component receiver domain inhibits the sigma54-dependent ATPase in DctD. *FASEB J* **15**: 1326–1328.
- Palmer TM, Stanton ML, Young TP, Goheen JR, Pringle RM, Karban R. (2008). Breakdown of an ant-plant mutualism follows the loss of large herbivores from an African savanna. *Science* **319**: 192–195.
- Post DM, Palkovacs EP. (2009). Eco-evolutionary feedbacks in community and ecosystem ecology: interactions between the ecological theatre and the evolutionary play. *Phil Trans R Soc B* **364**: 1629–1640.
- Reaves ML, Young BD, Hosios AM, Xu Y-F, Rabinowitz JD. (2013). Pyrimidine homeostasis is accomplished by directed overflow metabolism. *Nature* **500**: 237–241.
- Reid CJ, Poole PS. (1998). Roles of DctA and DctB in signal detection by the dicarboxylic acid transport system of *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* **180**: 2660–2669.
- Relman DA. (2008). ‘Til death do us part’: coming to terms with symbiotic relationships. *Nat Rev Microbiol* **6**: 721–724.
- Replansky T, Koufopanou V, Greig D, Bell G. (2008). *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology. *Trends Ecol Evol* **23**: 494–501.
- Robinson CJ, Bohannan BJ, Young VB. (2010). From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* **74**: 453–476.
- Romano JD, Kolter R. (2005). *Pseudomonas-Saccharomyces* interactions: influence of fungal metabolism on bacterial physiology and survival. *J Bacteriol* **187**: 940–948.
- Ronson CW, Nixon BT, Albright LM, Ausubel FM. (1987). *Rhizobium meliloti* ntrA (rpoN) gene is required for diverse metabolic functions. *J Bacteriol* **169**: 2424–2431.
- Sachs JL, Skophammer RG, Regus JU. (2011). Evolutionary transitions in bacterial symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 10800–10807.
- Salazar E, Díaz-Mejía JJ, Moreno-Hagelsieb G, Martínez-Batallar G, Mora Y, Mora J *et al.* (2010). Characterization of the NifA-RpoN regulon in *Rhizobium etli* in free life and in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4510–4520.
- Sambrook J, Russell DW. (2001). *Molecular Cloning* 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- Sanchez A, Gore J. (2013). Feedback between population and evolutionary dynamics determines the fate of social microbial populations. *PLoS Biol* **11**: e1001547.
- Schoener TW. (2011). The newest synthesis: understanding the interplay of evolutionary and ecological dynamics. *Science* **331**: 426–429.

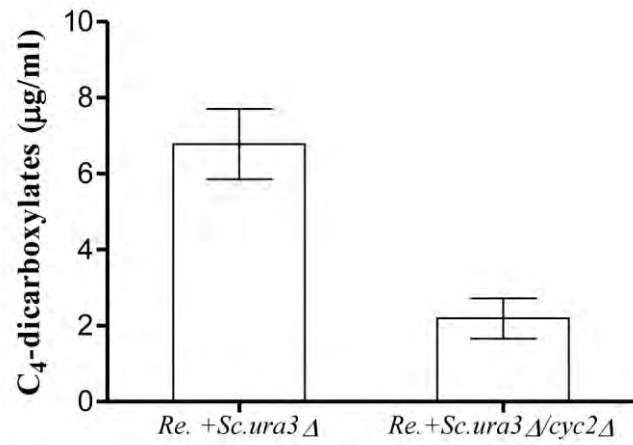
- Serrano R, Bernal D, Simón E, Ariño J. (2004). Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J Biol Chem* **279**: 19698–19704.
- Seyedsayamdost MR, Case RJ, Kolter R, Clardy J. (2011). The Jekyll-and-Hyde chemistry of *Phaeobacter gallaeciensis*. *Nat Chem* **3**: 331–335.
- Sheikh A, Yusuf A, Laconi E, Rao PM, Rajalakshmi S, Sarma DSR. (1993). Effect of orotic acid on in vivo DNA synthesis in hepatocytes of normal rat liver and in hepatic foci/nodules. *Carcinogenesis* **14**: 907–912.
- Shimosaka M, Fukuda Y, Murata K, Kimura A. (1984). Purine-mediated growth inhibition caused by a *pyrE* mutation in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **160**: 1101–1104.
- Simpson EH. (1949). Measurement of diversity. *Nature* **163**: 688.
- Smukalla S, Caldara M, Pochet N, Beauvais A, Guadagnini S, Yan C *et al.* (2008). FLO1 is a variable green beard gene that drives biofilm-like cooperation in budding yeast. *Cell* **135**: 726–737.
- Somvanshi VS, Sloup RE, Crawford JM, Martin AR, Heidt AJ, Kim K *et al.* (2012). A single promoter inversion switches *Photorhabdus* between pathogenic and mutualistic states. *Science* **337**: 88–93.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA *et al.* (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 15545–15550.
- Thompson JN. (1998). Rapid evolution as an ecological process. *Trends Ecol Evol* **13**: 329–332.
- Thompson JN. (1999). The evolution of species interactions. *Science* **284**: 2116–2118.
- Thompson JN. (1994). *The Coevolutionary Process*. University of Chicago Press: Chicago, IL.
- Wargo MJ, Hogan DA. (2006). Fungal-bacterial interactions: a mixed bag of mingling microbes. *Curr Opin Microbiol* **9**: 359–364.
- Whitham TG, Bailey JK, Schweitzer JA, Shuster SM, Bangert RK, LeRoy CJ *et al.* (2006). A framework for community and ecosystem genetics: from genes to ecosystems. *Nat Rev Genet* **7**: 510–523.
- Yoshida T, Jones LE, Ellner SP, Fussmann GF, Hairston NG. (2003). Rapid evolution drives ecological dynamics in a predator-prey system. *Nature* **424**: 303–306.
- Yurgel SN, Kahn ML. (2005). *Sinorhizobium meliloti* *dctA* mutants with partial ability to transport dicarboxylic acids. *J Bacteriol* **187**: 1161–1172.

Supplementary Information accompanies this paper on The ISME Journal website (<http://www.nature.com/ismej>)

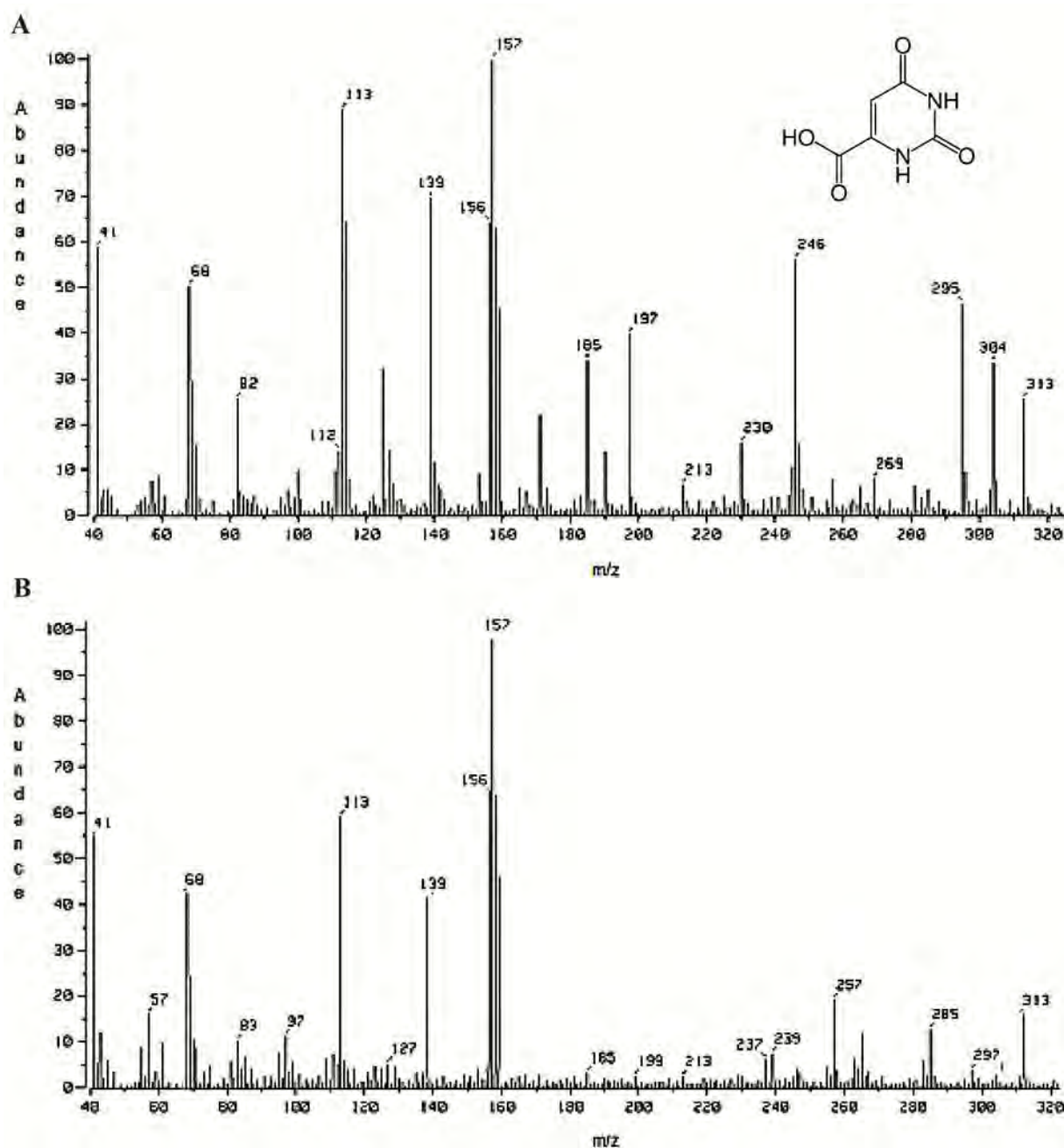
Supplementary figures S1-10.



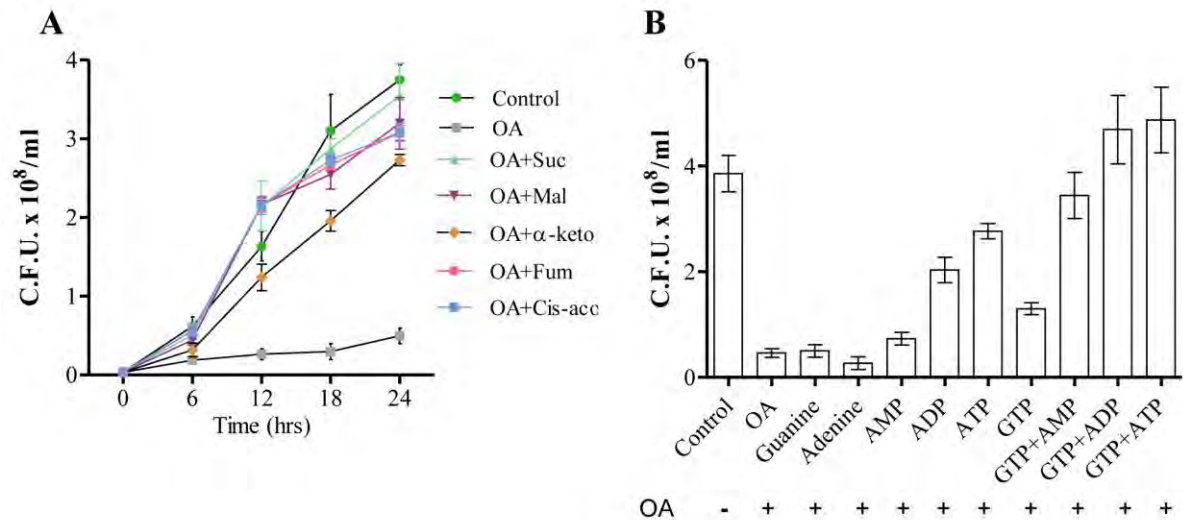
Supplementary Figure S1. OA is excreted by yeast lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase (*ura3p*) activity, which inhibits the growth of *R. etli* CE3. **A)** Wild-type *S. cerevisiae* Σ 1278b (wt) does not affect bacterial growth; the *S. cerevisiae* Σ 1278h *ura3* mutant inhibits *R. etli* CE3 growth. **B)** The genetic confirmation of the nature of PΣA. Yeast knock-out (in the BY4741 background) strains were tested against *R. etli* CE3 to identify the genes involved in PΣA biosynthesis. The yeast mutants unable to synthesize OA did not inhibit the growth of *R. etli* CE3. Approximately 1×10^6 cells of each yeast strain were placed on the PY-D plates inoculated with *R. etli* CE3 ($OD_{600nm} = 0.05$). **C)** The HPLC profile of the extract of *S. cerevisiae* Σ 1278h cultures. The fractions were tested against *R. etli* CE3 using a diffusion assay in PY-D plates. **D)** The activity of PΣA against *R. etli* CE3 is identical OA activity. OA (50 μ g) and PΣA (50 μ g) were placed on the PY-D plates inoculated with *R. etli* CE3 cells.



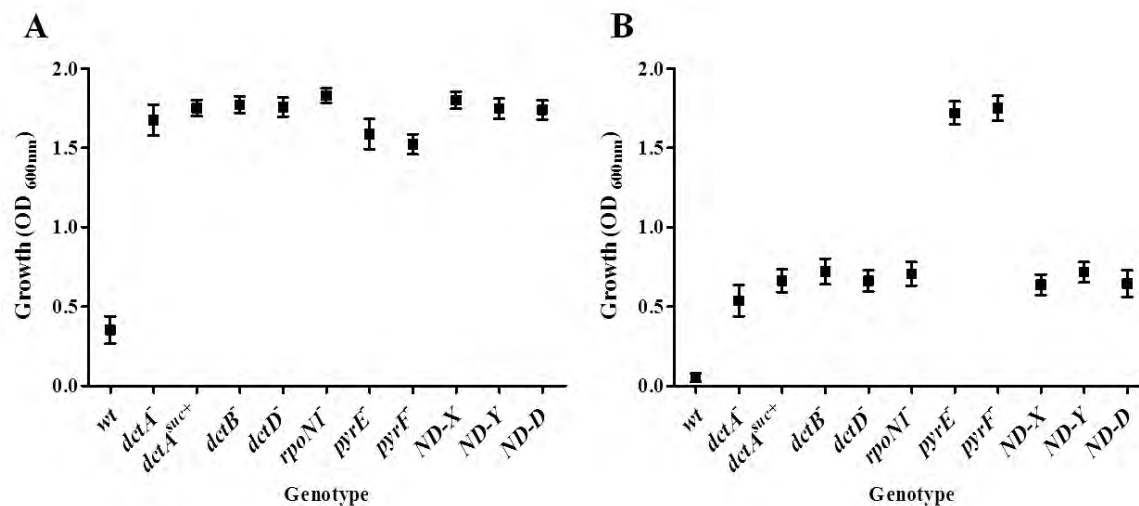
Supplementary Figure S2. C₄-dicarboxylate concentrations (plotted as the sum of malate, succinate, and fumarate) in the supernatants of cocultures at 12 hours. Coculture of *S. cerevisiae* BY4741 *ura3Δ* (*Re.+Sc.ura3Δ*) and coculture of *S. cerevisiae* *cyc2* mutant in the BY4741 background (*Re.+Sc.ura3Δ/cyc2Δ*). Panel show the means ±S. E. M. (n= 3).



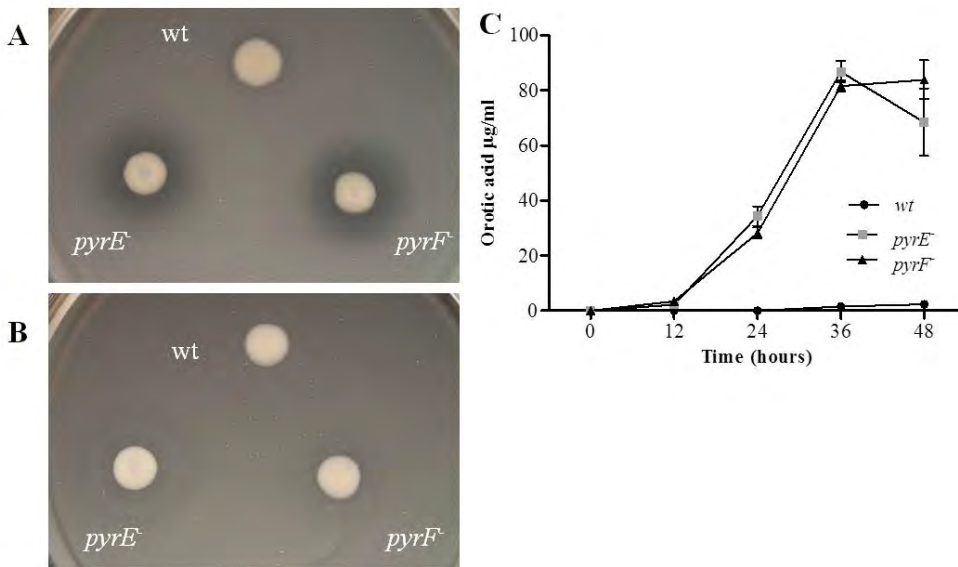
Supplementary Figure S3. The CIMS mass spectrum of standard OA (**A**) was identical to the PΣA spectrum (**B**), and both contain a molecular ion peak at m/z 157 ($M+H$)⁺ with characteristic fragments at m/z 113 ($M+H$) - CO₂, m/z 139 ($M+H$) - H₂O, m/z 69 (C₃H₂NO + H)⁺ and m/z 41 (C₃H₂NO) - HCN. In both spectra, we observed a protonated molecular dimer m/z 313 (2M + H)⁺.



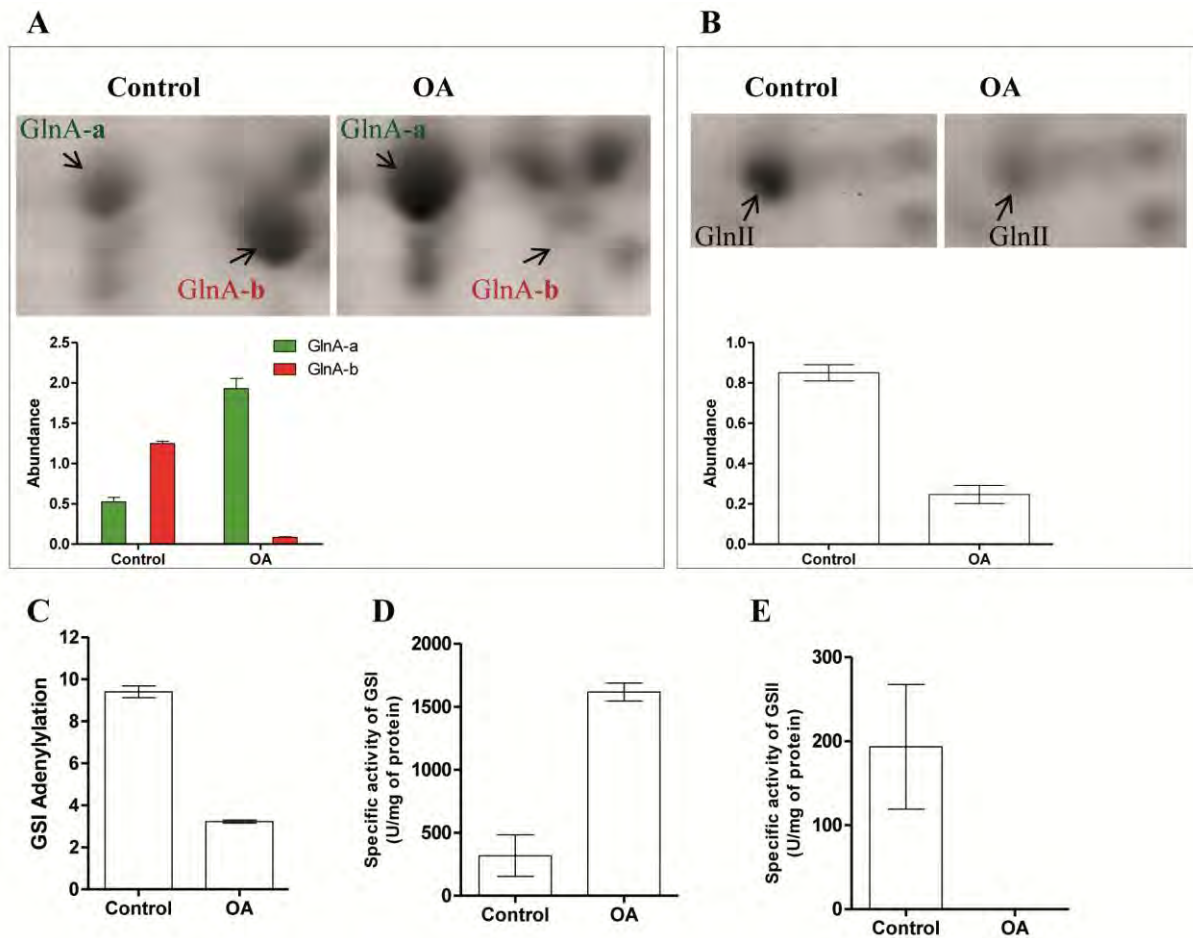
Supplementary Figure S4. Inhibition of OA effects by C₄-dicarboxylates and purines. **A)** C₄-dicarboxylates compete with OA for the available DctA permease and block OA transport. *R. etli* CE3 cells were grown in PY-D medium supplemented with H₂O (negative control), 100 μ g/ml OA and 100 μ g/ml OA plus 100 μ g/ml C₄-dicarboxylate tested as inhibitors. Succinate (Suc), Malate (Mal), α -ketoglutarate (α -keto), fumarate (Fum) and cis-aconitate (Cis-ac). **B)** *R. etli* CE3 cells were grown in PY-D medium supplemented with H₂O (negative control), 100 μ g/ml OA and 100 μ g/ml OA plus 1.5 mM/ml purine tested as inhibitors. C.F.U. were determined at 24 hours of culture. Panels show the means \pm S. E. M. (n= 3).



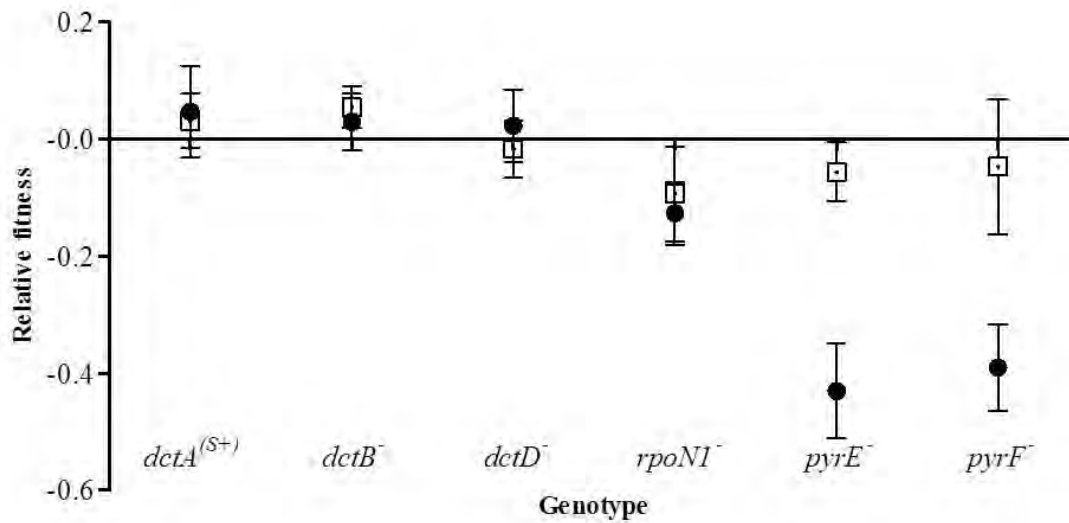
Supplementary Figure S5. The growth of *R. etli* wt and OA^R variants in liquid medium. **A)** Growth in PY-D medium with 100 μ g/ml OA. **B)** Growth in PY-D medium with 50 μ g/ml FOA. Optical densities were determined at 24 hours of culture. The panels show the means \pm S. E. M. (n= 3).



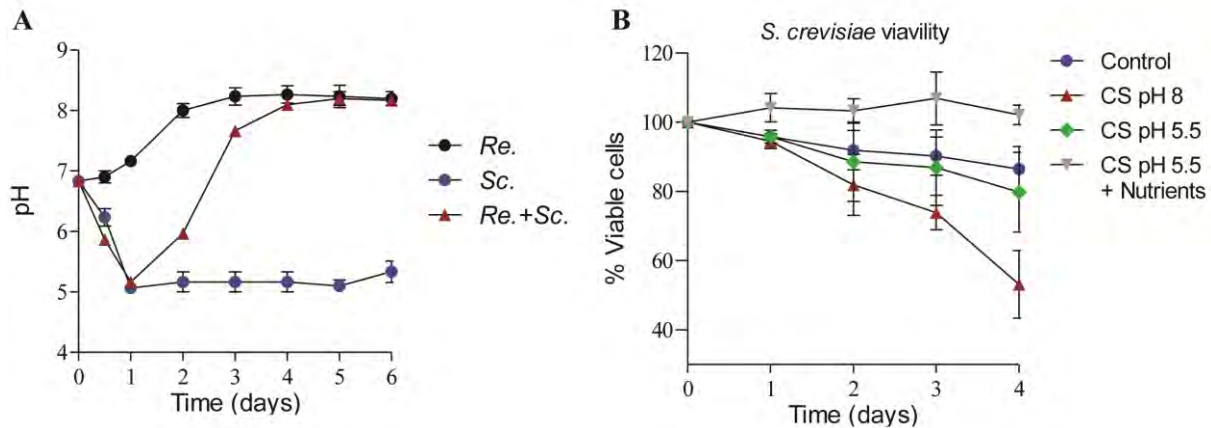
Supplementary Figure S6. *R. etli* CE3 mutants *pyrE* and *pyrF* accumulated OA in the culture medium. (A) OA excretion by *R. etli pyrE* and *pyrF* mutants inhibited the growth of *wt R. etli*. (B) OA accumulation was prevented by supplementation of the medium with uridine (25 µg/ml). (A-B) $\sim 1.2 \times 10^7$ cells of each strain were placed on the PY-D plates inoculated with *wt R. etli* ($OD_{600nm} = 0.05$). (C) OA concentrations in culture medium of *wt R. etli* and *pyrE* and *pyrF* mutants. The strains were grown in PY-D medium, and OA was quantified by HPLC. No OA accumulation was detected in the medium with the wild-type strain. These strains were spontaneous mutants isolated from cocultures. The panel show the means \pm S. E. M. (n= 3).



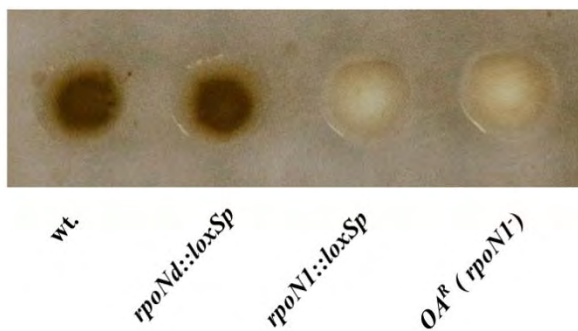
Supplementary Figure S7. The expression of L-glutamine synthetase (GlnA and GlnII) in *R. etli* was affected by OA. **A)** Two GlnA electrophoretic entities were identified by two-dimensional gel electrophoresis and were designated GlnA-a and GlnA-b. In the cells exposed to 50 $\mu\text{g/ml}$ OA, GlnA-a was up-regulated and GlnA-b down-regulated. The sum of the abundance of both entities is similar in both conditions. **B)** L-glutamine synthetase II was down-regulated in cells exposed to OA. The plots illustrate the statistical analysis of changes in protein abundance. The proteins were separated by 2-DE using ampholytes of pH 3–10 and were identified by peptide mass mapping via MALDITOF-MS. The data are the means \pm S. E. M. (n= 3). **C)** Adenylylation state of GSI. **D)** GSI specific activity. **E)** GSII specific activity. GS was measured via its transferase activity. The data are the means \pm S. E. M. (n= 3).



Supplementary Figure S8. In cocultures with yeast, *R. etli pyrE* and *pyrF* mutants were less competitive than *dctA* mutants. The relative fitness of the test genotype was determined relative to *R. etli dctA*⁻ (OAR-A1 strain) (initial ratio 1:1) in the presence of *S. cerevisiae* Σ 1278h in culture medium with 20 μ g/ml uridine (open symbols) and without uridine (filled symbols). Fitness is given as the difference in Malthusian parameters (m). A fitness of zero indicates that the two genotypes are equally fit. The competitive fitness was determined during a single 48-hour growth period. OAR-A1 strain (carrying a deletion of 150 nucleotides of *dctA*) and the competing isolate were differentiated by PCR of *dctA* gene. The panel show the means \pm S. E. M. (n= 3).



Supplementary Figure S9. A) In coculture, after 48 hours, *R. etli* alkalinized the culture media. *R. etli* CE3 monoculture (Re.), *S. cerevisiae* Σ 1278 monoculture (Sc.) and *R. etli* CE3- *S. cerevisiae* Σ 1278h coculture (Re.+Sc.). To identify the cause of the extinction of yeast, we performed experiments in which it was evaluated the effect of coculture supernatants (CS) in yeast viability. **(B)** Yeast cells of 7 days old monocultures were growth in filter-sterilized 7 days old cocultures supernatants. The yeasts were grown in: native CS which has a pH of 8.3 (CS pH 8); Buffered CS contained 150 mM MES pH 5.5 (CS pH 5.5); Buffered CS contained 150 mM MES pH 5.5 (CS pH 5.5) supplemented with 15 mg/ml yeast extract (CS pH 5.5 + Nutrients). Control is cells growing in supernatants of 7 days old yeast cultures (Control). The viability was determined by standard dilution plate counts and expressed as the percentage of the colony-forming units at time 0 h. Data are means \pm SD of three independent experiments.



Supplementary Figure S10. The detection of melanin production in *R. etli* wild-type cells, constructed mutants and *OA*^R variants with a mutation in the *rpoN1* gene. The strains were grown for 3 days in PY-D supplemented with L-tyrosine plus Cu_2SO_4 and incubated at 30 °C before SDS (1%) solution (Hawkins & Johnston, 1988).

Supplementary Tables S1-S9

Supplementary Table S1. List of strains and plasmids used in this study.

Strain	Relevant genotype	Reference
<i>R. etli</i>		
CE3	Sm ^r derivative of CFN42 strain	Noel <i>et al.</i> , 1984
CE3 <i>dctA</i> ⁻	CE3 <i>dctA</i> ::ΩKm	This study
CE3 <i>rpoN1</i> ⁻	CE3 <i>rpoN1</i> :: <i>loxSp</i>	Girard L., unpublished
CE3 <i>rpoNd</i> ⁻	CE3 <i>rpoNd</i> :: <i>loxSp</i>	Girard L., unpublished
<i>E. coli</i>		
DH5a	<i>supE 44Δ lacU169 (φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan <i>et al.</i> , 1991
HB101	<i>supE44 hsdS20 (r_B⁻m_B⁻) recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Boyer & Roulland-Dussoix D, 1969
<i>S. cerevisiae</i>		
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Invitrogen Corp., Huntsville, Ala.
Yeast knockouts strain collection (YKO)	BY4741 background and have a genotype of <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0, Kan^r</i>	Open Biosystems, Huntsville, AL, USA
Σ1278h	<i>MATa, ura3-52</i>	G. Fink, Cambridge, MA, USA
Plasmids		
pBBR1MCS5	pBBR1MCS derivative, Gm ^r	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pAT-dctA	pBBR1MCS5 derivative with <i>dctA</i> gene (2097 bp) BamHI/XbaI fragment;Gm ^r	This study
pAT-dctB-dctD	pBBR1MCS5 derivative with <i>dctB-dctD</i> operon (3922 bp) XhoI/XbaI fragment;Gm ^r	This study
pAT-dctB	pBBR1MCS5 derivative with <i>dctB</i> gene (2522 bp) XhoI/XbaI fragment;Gm ^r	This study
pAT-rpoN1	pBBR1MCS5 derivative with <i>rpoN1</i> gene (2168 bp) KpnI/XbaI fragment;Gm ^r	This study
pAT-pyrE	pBBR1MCS5 derivative with <i>pyrE</i> gene (1223 bp) BamHI/XbaI fragment;Gm ^r	This study
pAT-pyrF	pBBR1MCS5 derivative with <i>pyrE</i> gene (3169 bp) KpnI/XbaI fragment;Gm ^r	This study
pLAFR1	Broad-host-range cloning vector; Tc ^r	Friedman <i>et al.</i> , 1982
Sm ^r , streptomycin-resistant; Km ^r , kanamycin-resistant; Tc ^r , tetracycline-resistant; Sp ^r , spectinomycin-resistant.		

Supplementary Table S2. List of primers used to amplify entire *dctA*, *dctB*, *dctB-dctD* operon and the *rpoN1*, *pyrE* and *pyrF* genes.

^a Name	^b Sequence 5' > 3'	Position 5'>3'	Restriction site
dctA-BamHI-F	TATTGGATCC*GGTATCTTGGGAC	3112014 – 3112002	BamHI
dctA-XbaI-R	TGAGTCTAGA*GGAAGCAACCGCGA	3109918 – 3109931	XbaI
dctBD-XhoI-F	TACGA <u>CTCGAG</u> *TCATGCCGATGACG	3111198- 3111211	XhoI
dctBD-XbaI-R	TCAGC <u>TCTA</u> *GATTCCTGCTGCAT	3115120- 3115106	XbaI
dctB-XbaI-R	GTCAT <u>TCTAG</u> *AGGCGGAAACGGAGA	3113720- 3113706	XbaI
pyrE-BamHI-F	TGCCGGATCC*TCAATGAAGAG	485956 - 485966	BamHI
pyrE-XbaI-R	TCGGATCTAGA*TCCTCCCAACAGC	487178 - 487166	XbaI
pyrF-KpnI-F	TTATGGTACC*ACGACACCGATTTCG	324399 - 324386	KpnI
pyrF-XbaI-R	CTTATCTAGA*GCAATCCAATATGC	321231 - 321244	XbaI
rpoN1-KpnI-F	ATGTGGTACC*GAAGGACAAGCCCG	416948 - 416961	KpnI
rpoN1-XbaI-R	TTCATCTAGA*GGGAGAAATAGGCC	419115 - 419102	XbaI

a The first three letters of the primer name correspond to the PCR-amplified gene. The *dctBD* primers were used to amplify the *dctB-dctD* operon.

b Underlined, built-in restriction site; asterisk, start of the corresponding position in the *Rhizobium etli* CFN42 genome sequence (GenBank: CP000133.1).

Supplementary Table S3. List of primers used for sequencing.

Gene [^]	Primer	Seq 5'>3'	#Position 5'>3'
	DctA-F*	GAAATAAACACAGCGGCTTAGGC	3111660 – 3111638
<i>DctA</i>	DctA-FC	ATCTTCAAGCTCGTCGGCAT	3110925 – 3110906
	DctA-R*	GACGGGCCGCTGCAAATATC	3110145 – 3110164
	DctB-F*	CCAGGCAATGCGGAAACTCA	3111692 – 3111711
<i>DctB</i>	DctB-FA	ATATCAGGCAGCGACGGTCT	3112294 – 3112313
	DctB-R*	GTCATAGGCGGAAACGGAGA	3113725 – 3113706
<i>DctD</i>	DctD-F*	CGGATGGAAGTTGAGAGCGA	3113554 – 3113573
	DctD-R*	GACGATCCGGCAGGTGAAGA	3115016 – 3114997
	RpoN1-F*	CATGTGAAGGACAAGCCCGA	416943 – 416962
<i>rpoN1</i>	RpoN1-FA	ACTGGATTTCCGTGGCCTGA	417421 – 417440
	RpoN1-R*	GACACGGGAGAAATAGGCCA	419120 – 419101
<i>PyrE</i>	pyrE-F*	CTGATAGAGCCGTGTTGCGT	486353 – 486372
	pyrE-R*	TCGGATTCCTCCCAACAGCA	487184 – 487165
<i>PyrF</i>	pyrF-F*	CGGCGCAATCTCTATGCTT	322070 – 322051
	pyrF-R*	CGCGCAATCCAATATGCCTT	321228 – 321247

[^]Gene amplified by PCR and sequenced.

*Primers used to generate the PCR product.

Position in the *Rhizobium etli* CFN42 genome sequence (GenBank: CP000133.1).

Supplementary Table S4. IR spectral data (cm^{-1}) of PΣA and OA.

Assignment	PΣA	Orotic acid (Hernanz <i>et al.</i> , 2002)
v (OH)	3190	3241
v (NH)	3158, 3128	3154, 3137
v (CH)	3105	3099
v (C=Oacid +C(2)=O)	1712, 1682	1719, 1700
v (C=C) + v ring	1642	1653
v (C=N)	1425	1435

Supplementary Table S5. NMR spectral data of PΣA (300 MHz ^1H NMR, 125 MHz ^{13}C NMR in D_2O) and OA.

Position	PΣA		Orotic acid	
	δ_{H} (J in Hz)	δ_{C}	δ_{H} (J in Hz)*	δ_{C} **
2		155.52		155.0
4		170.84		170.29
5	6.25 (7.9)	104.15	6.18 (4)	103.87
6		151.42		150.97
8		167.86		167.36

* ^1H NMR Orotic acid data were obtained from the Human Metabolome Database (HMDB). Available at <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00226>.

** ^{13}C NMR data of diethanolamineorotic salt. Maistralis G, Koutsodimou A, Katsaros N (2000) Transition metal orotic acid complexes. *Trans. Metal Chem.* **25**, 166–173.

Supplementary Table S6. Yeast genes required for the the establishment of a commensal interaction. Yeast knock-out strains(YKO library, Open Biosystems) were tested against *R. etli* CE3 to identify mutants that did not promote bacterial growth within the inhibition zone (Fig. 1D).

ORF NAME	GENE	FUNCTION
YNL213C	YNL213C	Protein of unknown function; null mutant lacks mitochondrial DNA
YMR089C	YTA12	Component of the mitochondrial inner membrane m-AAA protease
YBR026C	ETR1	2-enoyl thioester reductase
YCR024C	SLM5	Mitochondrial asparaginyl-tRNA synthetase
YNR036C	MRPS12	Mitochondrial protein
YNL005C	MRP2	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YCR071C	IMG2	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YNR037C	RSM19	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YPR047W	MSF1	Mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase
YLL018C-A	COX19	Protein required for cytochrome c oxidase assembly
YMR158W	MRPS8	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YDL107W	MSS2	Peripherally bound inner membrane protein of the mitochondrial matrix
YJR113C	RSM7	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YJL023C	PET130	Protein required for respiratory growth
YNR041C	COQ2	Para hydroxybenzoate: polyprenyl transferase
YJL063C	MRPL8	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YJR077C	MIR1	Mitochondrial phosphate carrier
YNL081C	SWS2	Putative mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YBR003W	COQ1	Hexaprenyl pyrophosphate synthetase
YBL099W	ATP1	Alpha subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase
YJR122W	IBA57	Mitochondrial matrix protein
YPL132W	COX11	Mitochondrial inner membrane
YGL212W	VAM7	Component of the vacuole SNARE complex involved in vacuolar morphogenesis
YGL220W	FRA2	Protein involved in negative regulation of transcription of iron regulon
YDR295C	HDA2	Subunit of a possibly tetrameric trichostatin A-sensitive class II histone deacetylase complex
YNL160W	YGP1	Cell wall-related secretory glycoprotein
YBL044W	YBL0044	Putative protein of unknown function
YBL100C	YBL100C	Dubious open reading frame, completely overlaps the 5' end of ATP1
YDL146W	LDB17	Protein involved in the regulation of endocytosis
YDR042C	YDR042C	Putative protein of unknown function
YJR120W	YJR120W	Protein of unknown function;mutation causes decreased expression of ATP2
YDL198C	GGC1	Mitochondrial GTP/GDP transporter
YHR168W	MTG2	Putative GTPase, peripheral protein of the mitochondrial inner membrane
YER061C	CEM1	Mitochondrial beta-keto-acyl synthase

YCR003W	MRPL32	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YLR204W	QRI5	Mitochondrial inner membrane protein
YML087C	YML087C	Putative protein of unknown function
YNR020C	ATP23	Putative metalloprotease of the mitochondrial inner membrane
YLR038C	COX12	Subunit VIb of cytochrome c oxidase
YBR282W	MRPL27	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YJR048W	CYC1	Cytochrome c, isoform 1
YJR080C	AIM24	Protein of unknown function
YBR044C	TCM62	Protein involved in the assembly of the mitochondrial succinate dehydrogenase complex
YDR008C	YDR008C	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein
YGR111W	YGR111W	Putative protein of unknown function
YOL004W	SIN3	Component of the Sin3p-Rpd3p histone deacetylase complex
YNL197C	WHI3	RNA binding protein that sequesters CLN3 mRNA in cytoplasmic foci
YJL130C	URA2	Bifunctional carbamoylphosphate synthetase (CPSase)-aspartate transcarbamylase (ATCase)
YGR122W	YGR122W	Probable ortholog of <i>A. nidulans</i> PaIC, which is involved in pH regulation and binds to the ESCRT-III complex
YPR149W	NCE102	Protein of unknown function
YOR030W	DFG16	Probable multiple transmembrane protein
YMR184W	ADD37	Protein of unknown function involved in ER-associated protein degradation
YNR042W	YNR042W	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, completely overlaps verified gene COQ2
YNL064C	YDJ1	Protein chaperone involved in regulation of the HSP90 and HSP70 functions
YDL181W	INH1	Protein that inhibits ATP hydrolysis by the F1F0-ATP synthase
YNL117W	MLS1	Malate synthase, enzyme of the glyoxylate cycle
YJR102C	VPS25	Component of the ESCRT-II complex, which is involved in ubiquitin-dependent sorting of proteins into the endosome
YPR100W	MRPL51	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YBR037C	SCO1	Copper-binding protein of the mitochondrial inner membrane
YBL012C	YBL012C	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein
YKL208W	CBT1	Protein involved in 5' end processing of mitochondrial COB, 15S_rRNA, and RPM1 transcripts
YGR220C	MRPL9	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YJL102W	MEF2	Mitochondrial elongation factor
YJL096W	MRPL49	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YJR144W	MGM101	Protein involved in mitochondrial genome maintenance
YPL013C	MRPS16	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YDR175C	RSM24	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YNL177C	MRPL22	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YBL090W	MRP21	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YBL022C	PIM1	ATP-dependent Lon protease, involved in degradation of misfolded proteins in mitochondria
YBL045C	COR1	Core subunit of the ubiquinol-cytochrome c reductase complex (bc1 complex)

YDR231C	COX20	Mitochondrial inner membrane protein
YDR204W	COQ4	Protein with a role in ubiquinone (Coenzyme Q) biosynthesis
YDR230W	YDR230W	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein
YNL170W	YNL170W	Dubious open reading frame unlikely to encode a functional protein
YLR312W-A	MRPL15	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YBL038W	MRPL16	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YDR298C	ATP5	Subunit 5 of the stator stalk of mitochondrial F1F0 ATP synthase
YAL047C	SPC72	Component of the cytoplasmic Tub4p (gamma-tubulin) complex
YAL012W	CYS3	Cystathionine gamma-lyase
YLR260W	LCB5	Minor sphingoid long-chain base kinase
YDR194C	MSS116	DEAD-box protein required for efficient splicing of mitochondrial Group I and II introns
YPR116W	YPR116W	Putative protein of unknown function
YPR124W	CTR1	High-affinity copper transporter of the plasma membrane
YGL237C	HAP2	Subunit of the heme-activated, glucose-repressed Hap2p/3p/4p/5p CCAAT-binding complex
YJL180C	ATP12	Conserved protein required for assembly of alpha and beta subunits into the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase
YLR139C	SLS1	Mitochondrial membrane protein
YLR069C	MEF1	Mitochondrial elongation factor involved in translational elongation
YLR091W	GEP5	Protein of unknown function; detected in highly purified mitochondria
YMR267W	PPA2	Mitochondrial inorganic pyrophosphatase
YER017C	AFG3	Component of the mitochondrial inner membrane m-AAA protease
YOR201C	MRM1	Ribose methyltransferase
YOR221C	MCT1	Predicted malonyl-CoA:ACP transferase
YGR062C	COX18	Mitochondrial integral inner membrane protein
YMR150C	IMP1	Catalytic subunit of the mitochondrial inner membrane peptidase complex
YMR256C	COX7	Subunit VII of cytochrome c oxidase
YMR257C	PET111	Mitochondrial translational activator specific for the COX2 mRNA
YOR330C	MIP1	Catalytic subunit of the mitochondrial DNA polymerase
YPL173W	MRPL40	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YPL118W	MRP51	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YPL097W	MSY1	Mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase
YBR251W	MRPS5	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YBR268W	MRPL37	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YDR079W	PET100	Chaperone that specifically facilitates the assembly of cytochrome c oxidase
YDR375C	BCS1	Protein of the mitochondrial inner membrane that functions as an ATP-dependent chaperone
YEL024W	RIP1	Ubiquinol-cytochrome-c reductase
YEL050C	RML2	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YER050C	RSM18	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YHL038C	CBP2	Mitochondrial protein required for splicing of the group I intron
YLR201C	COQ9	Protein required for ubiquinone (coenzyme Q) biosynthesis

YKL003C	MRP17	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YKL170W	MRPL38	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YJL209W	CBP1	Mitochondrial protein that interacts with the 5'-untranslated region of the COB mRNA
YOR241W	MET7	Folylpolyglutamate synthetase
YPL005W	AEP3	Peripheral mitochondrial inner membrane protein
YOR211C	MGM1	Mitochondrial GTPase related to dynamin
YMR287C	DSS1	3'-5' exoribonuclease, component of the mitochondrial degradosome along with the ATP-dependent RNA helicase Suv3p
YDR405W	MRP20	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YMR228W	MTF1	Mitochondrial RNA polymerase
YOR037W	CYC2	Mitochondrial peripheral inner membrane protein
YOR305W	YOR305W	Protein of unknown function; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the mitochondrion
YOL033W	MSE1	Mitochondrial glutamyl-tRNA synthetase
YDR350C	ATP22	Mitochondrial inner membrane protein required for assembly of the F0 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase
YOR187W	TUF1	Mitochondrial translation elongation factor Tu
YLR025W	SNF7	One of four subunits of the endosomal sorting complex required for transport III (ESCRT-III)
YLL041C	SDH2	Iron-sulfur protein subunit of succinate dehydrogenase (Sdh1p, Sdh2p, Sdh3p, Sdh4p)
YLR056W	ERG3	C-5 sterol desaturase
YPL271W	ATP15	Epsilon subunit of the F1 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase
YBR179C	FZO1	Mitofusin, mitochondrial integral membrane protein
YOR200W	YOR200W	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein, partially overlaps the verified ORF MRM1/YOR201c
YOR205C	GEP3	Protein of unknown function, detected in purified mitochondria
YDR065W	YDR065W	Protein of unknown function, required for vacuolar acidification
YKL169C	YKL169C	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein; partially overlaps the verified gene MRPL38
YPL029W	SUV3	ATP-dependent RNA helicase, component of the mitochondrial degradosome along with the RNase Dss1p
YLR202C	YLR202C	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein
YKL002W	DID4	Class E Vps protein of the ESCRT-III complex
YPL065W	VPS28	Component of the ESCRT-I complex (Stp22p, Srn2p, Vps28p, and Mvb12p)
YPL084W	BRO1	Cytoplasmic class E vacuolar protein sorting (VPS) factor
YOR199W	YOR199W	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein
YMR293C	HER2	Subunit of the trimeric GatFAB AmidoTransferase(AdT) complex
YOL008W	COQ10	Coenzyme Q (ubiquinone) binding protein
YLR417W	VPS36	Component of the ESCRT-II complex
YPL002C	SNF8	Component of the ESCRT-II complex
YLR393W	ATP10	Mitochondrial inner membrane protein required for assembly of the F0 sector of mitochondrial F1F0 ATP synthase
YDR237W	MRPL7	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YDR322W	MRPL35	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit

YNL184C	YNL184C	Dubious open reading frame unlikely to encode a protein
YGR150C	CCM1	Protein required for intron removal of COB and COX1 pre-mRNAs

Supplementary Table S7. Comparative transcriptomics analysis of cells exposed to OA vs. unexposed cells. Notable differentially expressed genes out of 37 up-regulated genes (Z score, ≥ 1.7) and 108 down-regulated genes (Z score, ≤ -1.7).

Locus tag	Gene	Description	Z-SCORE
Up-regulated			
RHE_CH03023	PrsAch	ribose-phosphate pyrophosphokinase protein	1.87
RHE_CH00297	guaA1	GMP synthase - glutamine amidotransferase protein	2.52
RHE_CH01327	Amn	AMP nucleosidase protein	1.87
RHE_CH01049	cyaFch1	adenylate cyclase protein	2.00
RHE_CH00480	manB1	beta-mannosidase protein	1.98
RHE_CH00513	PhoU	phosphate uptake transcriptional regulator protein	2.38
RHE_CH00922	MatC	dicarboxylate carrier protein	1.84
RHE_CH01155	ypch00380	probable glutathione S-transferase protein	2.75
RHE_CH01192	ypch00396	probable multidrug resistance efflux system protein	3.93
RHE_CH01193	ypch00397	probable multidrug resistance efflux system protein	2.59
RHE_CH01194	ypch00398	probable adenylate cyclase protein	2.71
RHE_CH01237	Usg	usg protein (probable subunit of phosphoribosylanthranilate isomerase protein)	2.15
RHE_CH01301	yhch00388	hypothetical conserved protein	3.56
RHE_CH01370	exoF1	exopolysaccharide biosynthesis protein (OMA family outer membrane saccharide export protein)	1.88
RHE_CH01386	yhch00415	hypothetical conserved protein	2.58
RHE_CH01387	yhch00416	hypothetical conserved protein	2.83
RHE_CH01454	ypch00500	putative permease protein	2.26
RHE_CH01470	yhch00436	hypothetical conserved protein	2.77
RHE_CH01485	ypch00516	putative NTP pyrophosphohydrolase protein, MutT/nudiX family	2.09
RHE_CH01486	phnM2	phosphonate metabolism protein	1.78
RHE_CH01770	AldA	alanine dehydrogenase protein	2.05
RHE_CH01803	yhch00521	hypothetical conserved protein	2.29
RHE_CH02028	ypch00652	probable saccharide ABC transporter, ATP-binding protein	2.22
RHE_CH02421	ypch00814	putative phosphoribosylanthranilate isomerase subunit Usg protein	2.17
RHE_CH03006	yhch00905	hypothetical conserved protein	2.09
RHE_CH03060	ypch01073	probable acetyltransferase protein	3.31
RHE_CH03529	ypch01254	probable transcriptional regulator protein	1.75
RHE_CH03649	XylBch	xylose kinase protein	1.88
RHE_CH04000	NdvA	beta-1,2-glucan ABC transporter, ATP-binding protein	2.71
RHE_CH04064	ypch01440	putative acetyltransferase protein	2.02

RHE_PB00068	yhb00018	hypothetical conserved protein	1.92
RHE_PE00034	ype00016	putative transcriptional regulator protein	2.46
RHE_PE00135	ype00063	putative 4-oxalocrotonate tautomerase protein	2.43
RHE_PE00364	yhe00121	hypothetical conserved protein	1.91
RHE_PE00401	yhe00134	hypothetical conserved protein	3.95
RHE_PF00010	yhf00003	hypothetical conserved protein	2.14
Down-regulated			
RHE_CH01672	fusA2	elongation factor G protein	-2.88
RHE_CH01439	RpsR	30S ribosomal protein S18	-3.31
RHE_CH01440	RpsF	30S ribosomal protein S6	-2.58
RHE_CH00097	RpsA	30S ribosomal protein S1	-2.74
RHE_CH02312	RpsD	30S ribosomal protein S4	-2.04
RHE_CH01674	RpsJ	30S ribosomal protein S10	-1.98
RHE_CH01677	RplW	50S ribosomal protein L23	-2.43
RHE_CH01437	RplI	50S ribosomal protein L9	-2.23
RHE_CH01683	RpmC	50S ribosomal protein L29	-2.32
RHE_CH01663	rplK	50S ribosomal protein L11	-3.56
RHE_CH01664	rplA	50S ribosomal protein L1	-2.87
RHE_CH01666	rplL	50S ribosomal protein L7/L12	-3.27
RHE_CH01667	rpoB	DNA-directed RNA polymerase beta chain protein	-1.93
RHE_CH01685	rplN	50S ribosomal protein L14	-2.83
RHE_CH01686	rplX	50S ribosomal protein L24	-1.71
RHE_CH01687	rplE	50S ribosomal protein L5	-3.99
RHE_CH01691	rplR	50S ribosomal protein L18	-2.75
RHE_CH01692	rpsE	30S ribosomal protein S5	-3.15
RHE_CH01693	rpmD	50S ribosomal protein L30	-3.00
RHE_CH01698	rpsK	30S ribosomal protein S11	-2.56
RHE_CH01699	rpoA	DNA-directed RNA polymerase alpha chain protein	-3.04
RHE_CH01700	rplQ	50S ribosomal protein L17	-2.93
RHE_CH00018	yhch00004	hypothetical conserved protein	-2.29
RHE_CH00143	yhch00034	hypothetical protein	-2.41
RHE_CH00192	deoD	purine-nucleoside phosphorylase protein	-2.72
RHE_CH00223	yhch00047	hypothetical conserved protein	-3.02
RHE_CH00332	yhch00081	hypothetical conserved protein	-2.38
RHE_CH00479	yhch00115	hypothetical conserved protein	-1.98
RHE_CH00557	acd1	acyl-CoA dehydrogenase protein	-3.24
RHE_CH00680	flgKch	flagellar hook-associated protein	-2.65
RHE_CH00682	flaF	flagellin synthesis regulator protein	-1.97
RHE_CH00683	flbT	flagellin synthesis repressor protein	-2.80
RHE_CH00684	flgD	flagellar basal-body rod protein	-2.85
RHE_CH00826	yhch00200	hypothetical conserved protein	-2.00
RHE_CH00827	yhch00201	hypothetical protein	-1.70
RHE_CH00828	groELch1	60 kDa chaperonin, heat shock protein	-2.93

RHE_CH00829	groESch1	10 kDa chaperonin, heat shock protein	-2.61
RHE_CH00867	atpF2	ATP synthase subunit B protein	-2.55
RHE_CH00906	ypch00296	probable enoyl-CoA hydratase/isomerase protein	-2.73
RHE_CH01020	ypch00340	putative PspA family protein (suppresses sigma54-dependent transcription -negative regulator)	-1.57
RHE_CH01021	yhch00261	hypothetical conserved protein	-3.20
RHE_CH01132	cysH	phosphoadenosine phosphosulfate reductase protein (cysteine biosynthesis protein)	-2.59
RHE_CH01169	cspA2	cold shock protein	-1.70
RHE_CH01182	yhch00347	hypothetical conserved protein	-2.28
RHE_CH01238	groESch2	10 kDa chaperonin, heat shock protein	-2.86
RHE_CH01444	acpP	acyl-carrier protein	-2.34
RHE_CH01527	rrpP	pyrophosphate-energized proton pump (pyrophosphate-energized inorganic pyrophosphatase) protein	-2.22
RHE_CH01589	lon	ATP-dependent protease LA protein	-2.20
RHE_CH02041	ypch00659	probable NAD(P)H dehydrogenase protein	-3.56
RHE_CH02078	fpr	ferredoxin-NADP+ reductase protein	-1.99
RHE_CH02171	yhch00634	hypothetical conserved membrane protein	-2.91
RHE_CH02172	yhch00635	hypothetical conserved protein	-2.14
RHE_CH02231	yhch00658	hypothetical conserved membrane protein	-2.21
RHE_CH02239	yhch00662	hypothetical conserved protein	-2.42
RHE_CH02252	ypch00736	putative endonuclease protein	-2.12
RHE_CH02744	ilvC	ketol-acid reductoisomerase protein	-2.31
RHE_CH02761	yhch00833	hypothetical protein	-3.16
RHE_CH02912	yhch00865	hypothetical conserved protein	-1.94
RHE_CH02958	ypch01031	putative sulfite oxidase protein	-2.21
RHE_CH03021	ypch01059	probable Xaa-Pro dipeptidase protein	-2.00
RHE_CH03036	fbcC	cytochrome c1 protein	-2.79
RHE_CH03037	fbcB	ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome b subunit protein	-2.49
RHE_CH03038	fbcF	ubiquinol-cytochrome c reductase, iron-sulfur subunit protein	-2.15
RHE_CH03104	glnII	glutamine synthetase II protein	-3.82
RHE_CH03165	chvE	xylose ABC transporter, substrate-binding protein	-2.46
RHE_CH03172	xylF	xylose ABC transporter, substrate-binding protein	-4.31
RHE_CH03173	xylH	xylose ABC transporter, permease protein	-4.40
RHE_CH03174	xylG	xylose ABC transporter, ATP-binding protein	-3.49
RHE_CH03184	yhch00965	hypothetical conserved protein	-2.47
RHE_CH03273	rpoE4	RNA polymerase sigma factor protein (sigma-24)	-3.58
RHE_CH03274	yhch00988	hypothetical conserved protein	-3.25
RHE_CH03275	trcX	two-component response regulator protein	-2.99
RHE_CH03505	yhch01041	hypothetical conserved protein	-1.92
RHE_CH03550	pabB	para-aminobenzoate synthase component I protein	-2.19
RHE_CH03571	ibpA	molecular chaperone small heat shock protein	-3.27
RHE_CH03644	ypch01296	probable sugar ABC transporter, substrate-binding protein	-2.05
RHE_CH03855	fdsD	NAD-dependent formate dehydrogenase delta subunit protein	-2.64

RHE_CH03857	fdsA	NAD-dependent formate dehydrogenase alpha subunit protein	-2.12
RHE_CH03859	fdsG	NAD-dependent formate dehydrogenase gamma subunit protein	-2.06
RHE_CH04006	ypch01424	probable amino acid ABC transporter, substrate-binding protein	-2.29
RHE_CH04026	rpoH2	RNA polymerase sigma factor protein (sigma-70)	-2.25
RHE_CH04112	acsA2	acetyl-CoA synthetase protein	-1.91
RHE_PC00106	adhA2	alcohol dehydrogenase protein	-2.00
RHE_PC00110	ypc00055	putative DnaK suppressor protein	-2.00
RHE_PC00154	mctP	monocarboxylic acid permease protein	-2.45
RHE_PD00016	ypd00003	putative universal stress UspA protein	-3.57
RHE_PD00024	ypd00006	probable chalcone synthase protein	-2.46
RHE_PD00216	fnrNd	oxygen-dependent transcriptional regulator protein	-2.13
RHE_PD00299	yhd00101	hypothetical protein	-2.52
RHE_PD00300	hemNd1	coproporphyrinogen III oxidase protein	-2.66
RHE_PD00354	repCd	plasmid replication protein RepCd	-1.77
RHE_PE00024	ype00012	probable two-component sensor histidine kinase/response regulator hybrid protein	-2.60
RHE_PE00056	pcaG	protocatechuate 3,4-dioxygenase alpha chain protein	-2.25
RHE_PE00237	yhe00085	hypothetical protein	-2.48
RHE_PE00259	ype00128	probable sulfate uptake ABC transporter, sulfate-binding protein	-1.90
RHE_PE00260	ropAe	porin outer membrane protein	-2.41
RHE_PE00321	yhe00113	hypothetical protein	-2.17
RHE_PF00096	ypf00046	probable sugar ABC transporter, solute-binding protein	-2.60
RHE_PF00307	ypf00153	probable amino acid ABC transporter, substrate binding protein	-2.00
RHE_PF00328	yhf00109	hypothetical protein	-2.53
RHE_PF00329	groESf	10 kDa chaperonin, heat shock protein	-2.27
RHE_PF00402	adhCf	glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase protein	-2.44
RHE_PF00404	etfAf	electron-transport flavoprotein, alpha-subunit	-2.02
RHE_PF00442	ypf00233	putative glucoamylase protein	-2.18
RHE_PF00481	ypf00248	probable sugar ABC transporter, substrate-binding protein	-2.08
RHE_PF00485	ypf00252	probable gluconolactonase precursor protein	-2.45
RHE_PF00519	hemNf	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase protein	-2.31
RHE_PF00529	yhf00155	hypothetical protein	-2.32

Table S8. OA modifies the gene transcription of biochemical pathways in *R. etli* CE3.

PATHWAY	SIZE	NES	NOM p-val	FDR q-val
RIBOSOME	55	-3.1933644	0	0
METHANE METABOLISM	18	-2.0713499	0	0
OXIDATIVE PHOSPHORYLATION	79	-1.9322968	0	0.008653682
CITRATE CYCLE (TCA CYCLE)	26	-1.8220052	0	0.03619303
SULFUR METABOLISM	11	-1.7507883	0.011428571	0.07206561
GLYCOLISIS/GLUCONEOGENESIS	53	-1.7350935	0.008680556	0.07144607
PEPTIDOGLYCAN BIOSYNTHESIS	19	-1.7107781	0.007434944	0.07658505
PANTOTHENATE AND COA BIOSYNTHESIS	22	-1.6461647	0.014035088	0.123494245
FLAGELLAR ASSEMBLY	35	-1.6371095	0.010544815	0.117653854
NICOTINATE AND NICOTIAMIDE METABOLISM	18	-1.5799237	0.0415879	0.16558586
PYRIMIDINE METABOLISM	54	-1.5316945	0.015789473	0.21417348
ONE CARBON POOL BY FOLATE*	17	1.5830315	0.017167382	0.98257905

Size = Number of genes in each gene set; **NES** = normalized enrichment score (likelihood genes comprising a given cluster are overrepresented at a given end of the rank list); **Nom p value** = statistical significance of the enrichment score for a single gene set; and **FDR** = q value, false discovery rate. Positive enrichment (OA set with more transcripts with a higher ranking than the control) is depicted with an asterisk (*). Negative enrichment (more transcripts with a lower ranking) is depicted in bold. The genes were ranked according to the Z-score of differences with and without OA. This ranking was then used in modified GSEA for cluster analysis.

Supplementary Table S9. Characteristics of the individual OA^R clones evolved from the parental strain *R. etli* CE3. The growth yields were measured by OD₆₀₀ at 24 hours. The values are the means ± standard deviations from three independent cultures of each strain.

Isolate	Group	Genotype	PY-DOA	PY-DFOA	MM-S	MM-S+Uridine	MM-D	MM-D+Uridine	Melanin
CE3	Wt	Wt	0.51 ± 0.085	0.08 ± 0.025	1.12 ± 0.087	1.22 ± 0.21	0.98 ± 0.102	1.16 ± 0.181	+
OAR-A1	<i>Dct</i>	<i>dctA</i> -	1.685 ± 0.1652	0.48 ± 0.106	0.1 ± 0.016	0.14 ± 0.056	1.03 ± 0.043	1.21 ± 0.105	+
M48-B12	<i>dctA-suc</i> +	<i>dctA</i> - (<i>suc</i> +))	1.775 ± 0.087	0.64 ± 0.1258	0.97 ± 0.173	1.02 ± 0.192	1.13 ± 0.216	1.29 ± 0.13	+
M72-E9	<i>Dct</i>	<i>dctB</i> -	1.8 ± 0.092	0.708 ± 0.14	0.12 ± 0.078	0.18 ± 0.059	1.1 ± 0.172	1.26 ± 0.21	+
M72-F12	<i>Dct</i>	<i>dctD</i>	1.79 ± 0.104	0.646 ± 0.115	0.13 ± 0.056	0.203 ± 0.12	1.07 ± 0.21	1.34 ± 0.085	+
M48-B6	<i>RpoNI</i>	<i>rpoNI</i>	1.85 ± 0.081	0.694 ± 0.13	0.15 ± 0.076	0.201 ± 0.058	0.99 ± 0.14	1.09 ± 0.15	-
FOAR-A7	Ura-	<i>pyrE</i>	1.591 ± 0.115	1.717 ± 0.125	0.058 ± 0.021	1.24 ± 0.106	0.047 ± 0.17	1.2 ± 0.095	+
OA72-G4	Ura-	<i>pyrF</i>	1.56 ± 0.109	1.748 ± 0.135	0.053	1.23 ± 0.13	0.06 ± 0.015	1.21 ± 0.13	+
M48-B1	<i>dct</i> -pd	ND	1.827 ± 0.092	0.612 ± 0.112	0.89 ± 0.073	0.98 ± 0.092	0.97 ± 0.17	1.05 ± 0.074	-

M48-C12	dct-pd ⁻	ND	1.784 ± 0.109	0.711± 0.11	0.18 ± 0.037	0.09 ± 0.028	0.12 ± 0.076	0.14 ± 0.032	-
AO48-A4	ND-Z	ND	1.32 ± 0.21	0.32 ± 0.12	1.07 ± 0.18	1.23 ± 0.16	1.12 ± 0.081	1.09 ± 0.069	+
AO48-G1	ND-D	ND	1.773 ± 0.104	0.634± 0.142	0.16 ± 0.064	0.21 ±0.13	0.08 ± 0.027	0.1 ± 0.03	+

References

Boyer HW, Roulland-Dussoix D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 41, 459–472.

Friedman AM, Long SR, Brown SE, Buikema WJ, Ausubel FM. (1982). Construction of a broad host range cosmid cloning vector and its use in the genetic analysis of *Rhizobium* mutants. *Gene* 18, 289–296.

Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. (1991). Bacterial Genetic Systems, J. H. M. B. T.-M. in *Enzymology*, Ed., vol. 204, pp. 63–113.

Hernanz A, Billes F, Bratu I, Navarro R (2000) Vibrational analysis and spectra of orotic acid. *Biopolymers* 57, 187–198.

Kovach ME, *et al.* (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* 166, 175–176.

Noel KD, Sanchez A, Fernandez L, Leemans J, Cevallos MA. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* 158, 148–155.

Supplementary Material and Methods

Purification of bacterial growth inhibitor.

S. cerevisiae Σ 1278h cells were inoculated at $\sim 2.6 \times 10^5$ cells/ml in MMD medium (1.6 mM KH_2PO_4 , 0.83 mM MgSO_4 , 10 mM NH_4Cl , 25 mM dextrose, 2 mM CaCl_2 , 18.49 μM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2 $\mu\text{g/L}$ biotin and 178 μM uracil) and incubated for 24 hours at 30 °C. Conditioned medium (CM) was collected by removing the cells by centrifugation and filtration and was stored at -20 °C. Four liters of CM were lyophilized and extracted once with 400 ml of methanol. The extract was evaporated to dryness in vacuum. The residue was washed three times with 100 ml of acetonitrile-methanol (4:1) and washed three times with 3ml of tri-distilled water. The precipitated material was recovered by centrifugation and vacuum drying. A white powder was obtained and was dissolved in H_2O (1 mg/ml) and fractionated by reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) on a preparative Hypersil 10 C18 column (10 μm , 250 x 100 mm) operating at 1 ml/min with a gradient from 5% acetonitrile in H_2O to 100% acetonitrile over 35 min. The separation was monitored at 272 nm (Supplementary Figure S3C) with a diode array detector (Waters 996), and 3 fractions were collected, dried in vacuum and dissolved in H_2O . Only one fraction (which we designated P Σ A, an amorphous white powder) inhibited the growth of *R. etli* CE3 (Fig. S3D).

The identity of P Σ A was confirmed by analytical methods. The IR spectrum (4000-400 cm^{-1}) (KBr) was recorded with a Perkin-Elmer model 521 grating spectrophotometer Table S1. Low-resolution positive Chemical Ionization mass spectrometry (CIMS) was performed using a JMS-700 MStation High Resolution JEOL Mass Spectrometer with methane as the reagent gas. The experimental conditions were as follows: the source pressure was 2.4×10^{-6} mm Hg, the electron energy was 235 eV and the source temperature was 250 °C. The probe temperature was raised from 25 to 250 °C with intervals of 128 °C/min. The compounds were dissolved (5 mg/ml) in

methanol/H₂O (2:1 v/v) and pH adjusted to 7 with NaOH. The CIMS of PΣA was identical (Supplementary Figure S4) to the OA spectrum (Sigma Aldrich Cat # O2750).

NMR spectra were recorded using a Jeol EX 400 Eclipse instrument operating at 161.997 MHz. The ³¹P NMR chemical shift is referred to as 85 % H₃PO₄. The complete structure of PΣA was finally solved by interpreting one- and two-dimensional NMR spectra (¹H and ¹³C NMR and gHSQC; Supplementary Table S5). Overall, the results of these analyses indicated that the molecule responsible for inhibiting the growth of *R. etli* CE3 was OA.

Quantification of orotic acid and organic acids.

HPLC organic acids analysis was performed as previously described (Encarnación *et al.*, 1995). For the quantification of OA, the culture media were filtered through membrane filters (type HA, 0.45-µm pore size; Millipore Corp., Milford, MA, USA), and 20 µl samples were analyzed by HPLC. The HPLC system (Waters Chromatography Division, Millipore Corp.) was equipped with an isocratic pump (Waters 510) and a diode array detector (Waters 996). The analyses were performed isocratically at 0.9 ml/min and 60 °C with three Shodex Ion-Pak KC-811 columns (300 x 8 mm i.d.). OA and organic acids were eluted with a mobile phase of 1.25 mM HClO₄ and were reacted with 0.2 mM bromothymol blue–15 mM Na₂HPO₄–2 mM NaOH buffer (pH 10.5) through the reaction coil. Organic acid was detected at 436 nm and OA at 272 nm. The method linearity for OA quantification was determined with 11 aqueous standard solutions (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 µg/ml). Three injections were performed for each solution. The linear regression coefficient between the theoretical and measured concentrations was calculated.

Orotic acid and selected bacterial strains assays.

R. etli strains were tested against OA using the diffusion assay. Overnight, cultures of each test strain in PY-D were diluted 1000-fold into PY-D containing 1.5 % agar and poured into standard Petri dish plates. Five micrograms of OA was placed on top of the agar. The plates were

incubated at 30°C for 24 hours, and the presence or absence of an inhibition zone was monitored visually. In addition, the assay was conducted in liquid media. *R. etli* strains were tested in YP-D. Inocula for each test strain was prepared by suspending a colony selected from an agar plate in 5 ml of PY-D in 50 ml bacterial culture tubes. These were grown overnight and then adjusted to $\sim 1 \times 10^8$ cells/ml. These cell suspensions were used to inoculate 1 ml of appropriate medium at $\sim 8 \times 10^6$ cells/ml. The cultures were supplemented with 50 μ l of medium (negative control), 50 μ l of H₂O (negative control) or 50 μ l of OA at either 2 mg/mL or 10 mg/ml. The assay for each test strain was conducted in triplicate. The tubes were incubated with shaking (200 r.p.m.) for 24 hours at 30°C, and each OD_{600 nm} was determined. No significant differences in OD_{600 nm} were observed in the wells supplemented with medium vs. those supplemented with H₂O.

Inhibition of OA effects by C₄-carboxylates and purines.

The *R. etli* CE3 cells were grown overnight in PY medium. These cell suspensions were used to inoculate 1 ml of PYD medium at $\sim 4 \times 10^6$ cells/ml. The culture medium was supplemented with 100 μ g/ml OA, and the metabolites were tested as inhibitors (Supplementary Figure S5). The medium pH was adjusted to 7 with NaOH or HCl and sterilized by filtration. The tubes were incubated with shaking (200 r.p.m.) for 24 hours at 30°C, Bacterial concentrations in C.F.U./ml were determined to evaluate growth.

Proteomic analysis of *R. etli* CE3.

Cultures were prepared as described in the transcriptome experiments above. After 4 hours of growth in MM-D medium, the cells were exposed to 50 μ g/ml OA for 1 hour, collected by centrifugation, flash-frozen and stored in liquid nitrogen. The cells were washed with 1X phosphate-buffered saline. Total protein was obtained by sonication at 24 kHz for 30 s in the on position and 1 min in the off position for five cycles at 4°C using a Vibra Cell (Sonics, United States) in the presence of a protease inhibitor (Complete tablets; Roche Diagnostics GmbH,

Mannheim, Germany). Protein isolation was performed using phenol extraction (Encarnación *et al.*, 2003). Protein solubilization, preparative two-dimensional gel electrophoresis (2-DGE), 2D-Gel image analysis data and protein identifications (MALDI-TOF-MS) were performed as previously described (Encarnación *et al.*, 2003).

GS determination.

Cultures were prepared as described in the proteome experiments. The cells were exposed to 50 µg/ml of OA for 1 hour. GS was measured by transferase activities as described by Bender *et al.* (1997). The specific activities were expressed as units (U) per milligram of protein; 1 U represents 1 nM of γ -glutamylhydroxamate produced per min. The two GS activities were distinguished by their different heat stabilities for 1 hour at 50°C and their different sedimentations on sucrose density gradients as described below. The adenylation state of GSI was determined by calculation of the ratio of transferase activities measured in the presence and absence of added Mg₂ as described by Shapiro and Stadtman (Darrow & Knotts, 1977).

References.

- Bender RA, Janssen KA, Resnick AD, Blumenberg M, Foor F, Magasanik B. (1977). Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. J Bacteriol 129: 1001–1009.
- Darrow RA, Knotts RR. (1977). Two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. Biochem Biophys Res Commun 78: 554–559.
- Encarnación S, Dunn M, Willms K, Mora J, Dunn M, Willms K, *et al.* (1995). Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. J Bacteriol 177: 3058-3066.
- Encarnación S, Guzmán Y, Dunn MF, Hernández M, Vargas MDC, Mora J. (2003). Proteome analysis of aerobic and fermentative metabolism in *Rhizobium etli* CE3. Proteomics 3: 1077–1085.