



## PRESENCIA DE SISTEMAS DE SECRECIÓN DE PATÓGENOS EN BACTERIAS ENDOSIMBIÓTICAS AISLADAS DE *LUPINUS* DE LA PENÍNSULA IBÉRICA

Pastor, Víctor; Iglesias, Ana Isabel; Duran, David

Tutor: Rey, Luis

Departamento de Biotecnología, E.T.S. Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, s/n 28040 Madrid

Correo electrónico: [victor.pastor.martin@alumnos.upm.es](mailto:victor.pastor.martin@alumnos.upm.es); [anuss\\_1976@yahoo.es](mailto:anuss_1976@yahoo.es); [david.duran.wendt@alumnos.upm.es](mailto:david.duran.wendt@alumnos.upm.es)

### RESUMEN

Los rizobios son bacterias endosimbióticas capaces de fijar nitrógeno en estructuras especializadas de leguminosas llamadas nódulos. Esta simbiosis es altamente específica y depende, entre otros factores, de la capacidad de los rizobios de secretar proteínas efectoras a las células vegetales. Se han descrito diferentes sistemas de secreción en patógenos animales y vegetales y posteriormente también se han encontrado en algunos rizobios.

En este trabajo se presenta el estudio de varios sistemas de secreción identificados en dos cepas LmjC e ISLU101 aisladas de *Lupinus mariae-josephae* Pascual y *Lupinus angustifolius* L., respectivamente.

LmjC posee un sistema de secreción tipo III formado por agrupación de 33 genes cuya expresión dependería del activador transcripcional TtsI mediado a su vez por flavonoides secretados por la planta huésped. La cepa ISLU101 tiene dos sistemas de tipo VI de 13 y 17 genes cada uno. La importancia en la simbiosis de estos sistemas se está estudiando en estos momentos.

**Palabras clave:** *Bradyrhizobium*, sistema de secreción, simbiosis

### INTRODUCCIÓN

Uno de los factores implicados en la virulencia de determinadas bacterias patógenas son los sistemas de secreción que actúan como jeringas inyectando proteínas denominadas efectores directamente al interior de las células del organismo huésped. Inicialmente se describieron en la virulencia de patógenos animales, posteriormente en patógenos vegetales y más recientemente se está estudiando su papel en organismos simbióticos como los rizobios (Deakin y Broughton 2009). El sistema mejor estudiado en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa es el de tipo III (T3SS); otros sistemas relacionados son los sistemas de tipo IV (T4SS) y de tipo VI (T6SS). Como ejemplo del papel de estos sistemas en la simbiosis se sabe que la bacteria *Bradyrhizobium japonicum* mejora la nodulación con la planta *Vigna sinensis* (L) Walp. cuando se muta su T3SS, sin embargo la mutación no tiene efecto en la relación con soja (Krause et al., 2002). Por tanto la presencia de sistemas de secreción puede ser beneficioso, perjudicial o irrelevante en la simbiosis con según el rizobio y la leguminosa implicados.

En este trabajo se está estudiando un T3SS de la cepa LmjC aislada de *L. mariae-josephae* y dos T6SS de la cepa ISLU101 aislada de *Lupinus angustifolius*.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### Secuenciación

La obtención de la secuencia de las cepas ISLU101 e LmjC se obtuvo mediante secuenciación masiva en el Institute for Genome Sciences at the University of Maryland School of Medicine in Baltimore, EEUU. La anotación se realizó con la herramienta informática Manatee.



## Elaboración de árboles filogenéticos

La construcción de árboles filogenéticos se llevó a cabo mediante la plataforma <http://www.phylogeny.fr> (Dereeper et al., 2010)

## Construcción de mutantes

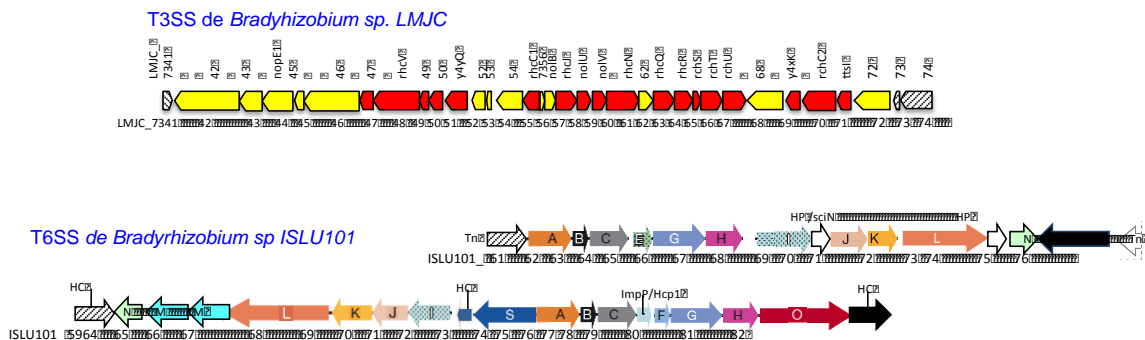
La construcción de mutantes se realizó mediante la amplificación de una región interna del gen de interés que se clonó primero en el vector pCR2.1-TOPO y posteriormente en el vector pK18mobSac. La mutación se incorporó al genoma mediante recombinación (Schäfer et al., 1994).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una vez disponible la secuencia genómica de las dos cepas de estudio, LmjC e ISLU101, se realizaron análisis de tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para identificar la presencia de sistemas de secreción. Se identificó un T3SS en la cepa LmjC, ausente en ISLU101. El sistema está formado por una agrupación de 33 genes, que incluye el activador transcripcional *ttsI* descrito como regulador de T3SS en *Bradyrhizobium japonicum* por Zehner et al., 2008. Para conocer el grado de conservación de este sistema de secreción respecto al que presentan otras bacterias se han comparado las secuencias de diferentes genes y se ha encontrado, respecto a los genes que codifican para elementos estructurales del sistema de secreción, un alto grado de conservación con *B. japonicum* USDA 110 y *Mesorhizobium loti* MAFF303099. Sin embargo en la agrupación génica de la cepa LmjC se han identificado posibles efectores específicos no conservados en bacterias endosimbióticas como los genes LmjC\_7342, 7343, 7346 y 7372 (ver figura 1).

Para mostrar la relación filogenética de este sistema se presenta la posición del gen *ttsI* en el árbol de la figura 2A. La expresión de este gen se está analizando mediante la fusión transcripcional con el gen delator *gusA*.

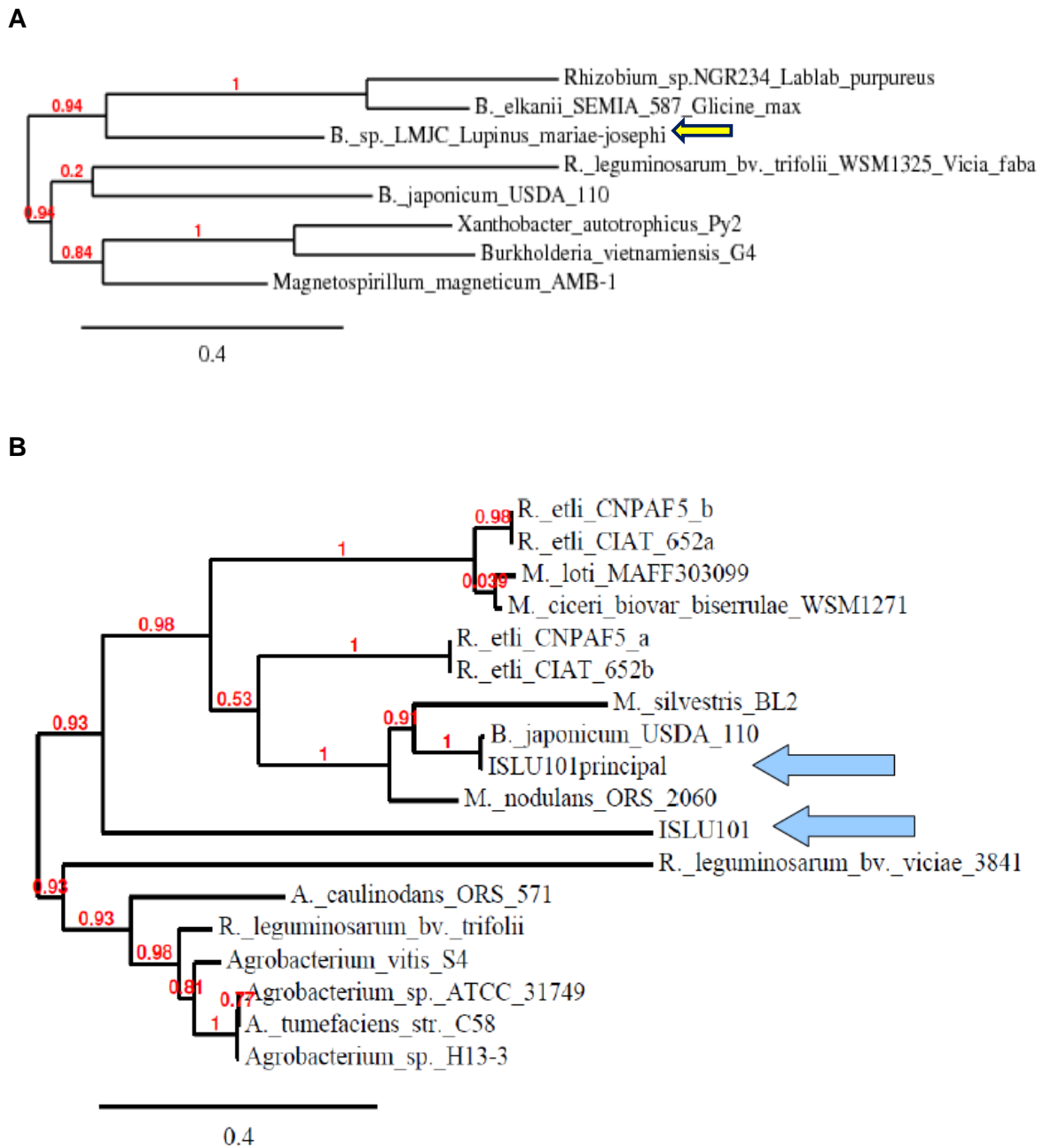
**Figura 1. Sistemas de secreción identificados en las cepas LmjC e ISLU101. Sistema de tipo III, T3SS, sistemas de tipo VI, T6SS. Los genes rayados no forman parte de los sistemas de secreción.**



El sistema de secreción tipo VI es un sistema descrito recientemente y se ha estudiado casi exclusivamente en bacterias patógenas. La cepa ISLU101 tiene dos T6SS, uno de ellos denominado T6SS1, formado por 17 genes (*impABCPFGHOSIJKLM-1M,2N* y *CP2*) y el otro, T6SS2, por 13 genes: *imp2ABCEGHIJKLN* y *HP* y *HP1* (ver figura 1). T6SS1 muestra un alto grado de conservación respecto a *B. japonicum* USDA110 (90%) y T6SS2 tiene una mayor similitud con bacterias que no nodulan.



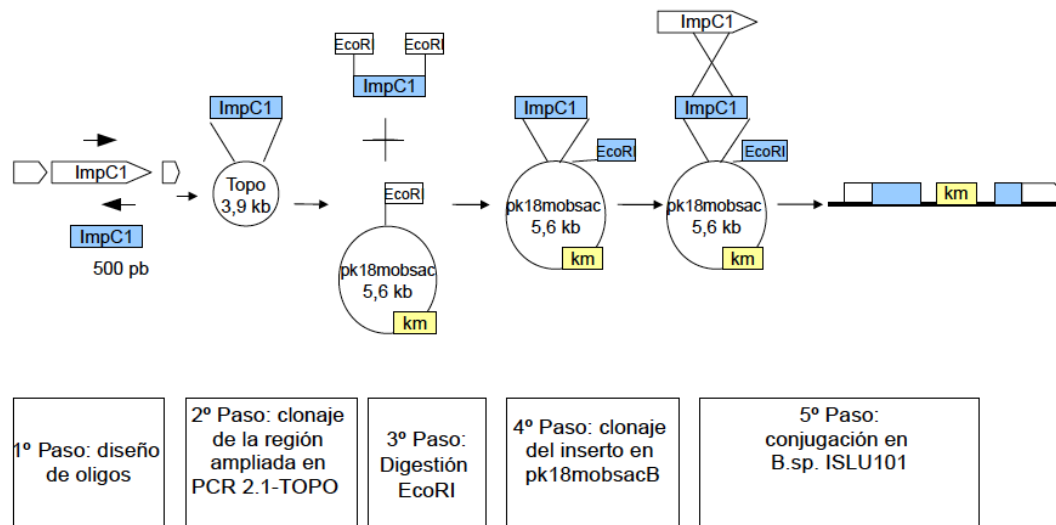
**Figura 2: Árboles filogenéticos de los genes *ttsI* de la cepa LmjC(A) y un concatenado *impB/impC* de ISLU101 (B). Los genes de LmjC e ISLU101 se resaltan con un flecha. La barra indica el número de sustituciones por sitio y los valores al porcentaje de “bootstrap”**



Para evaluar la importancia de estos sistemas en la simbiosis se ha iniciado la mutagénesis de 4 genes mediante la eliminación de una zona central de los genes de 300-500 pb. Los genes elegidos están descritos como importantes en patógenos y son: *ImpC*, *ImpC2*, *ImpO* e *ImpS*. El proceso seguido para la obtención de mutantes se presenta en la figura 3.



**Figura 3. Proceso seguido para la obtención de mutantes por eliminación de la zona central del gen.**



## CONCLUSIONES

La cepa LmjC, aislada de *Lupinus mariae-josephae*, posee un sistema de secreción tipo III formado por agrupación de 33 genes, similar al de *B. japonicum* USDA 110 y *M. loti* MAFF303099 con posibles efectores específicos.

La cepa ISLU101 aislada *Lupinus angustifolius* tiene dos sistemas de secreción de tipo VI de 17 y 13 genes cada uno, el primero con un 90% de identidad con *B. japonicum* y el segundo con baja similitud con otros rizobios.

Para establecer en qué condiciones se expresan estos sistemas en estos momentos se están realizando fusiones transcripcionales de los genes *ttsI* de la cepa LmjC y de los dos genes *impA* de ISLU101.

Por otra parte para conocer su importancia en la simbiosis con sus hospedadores originales y otros diferentes se están realizando mutaciones en genes esenciales de los diferentes sistemas: en el gen *ttsI* de LmjC y en los dos genes *impC1*, *impC2*, *impO* e *impS* de ISLU101. En estos momentos se están examinando su fenotipo en planta.

## AGRADECIMIENTOS

Al profesor Tomás Ruiz Argüeso (Universidad Politécnica de Madrid) por su consejo y sugerencias. Este trabajo ha sido financiado por varios proyectos: P90210514 (Fundación BBVA), QM100050067 (Comunidad de Madrid-UPM) y AL11-PID-09 (UPM-Actividades con Latinoamérica-México).

## BIBLIOGRAFIA

- Deakin y Broughton, 2009 Nat Rev Microbiol 7:312-320
- Dereeper A., Audic S., Claverie J.M., Blanc G . 2010 BMC Evol Biol 12:10:8.
- Krause, A., Doerfel, A. And Göttfert, M. 2002. Mol Plant-Microbe Interact 15:1228-1235
- Sánchez-Cañizares, C., Rey, L., Durán, D., Temprano, F., Sánchez-Jiménez, P., Navarro, A., Polajnar, M., Imperial, J., Ruiz-Argueso, T. 2011. Syst Appl Microbiol 34: 207-215
- Schäfer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. 1994 Gene 145: 69-63.
- Zehner, S., Schober, G., Wenzel, Lang, K.,Goettfert M. 2008. MPMI 21:1087-1093