

Caracterización del sistema de secreción de tipo VI en *Rhizobium etli* Mim1

A. Salinero¹, A. Pacheco¹, D. Valle¹, D. Durán¹, T. Ruiz-Argüeso¹, J. Imperial^{1,2}, E. Martínez-Romero³, E. Ormeño-Orrillo⁴, JM. Palacios¹, L. Rey¹

¹Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal (ETS de Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas) y Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid; ²CSIC, Madrid; ³Instituto de CC Genómicas Cuernavaca, México; ⁴Universidad Agraria La Molina, Lima, Perú

Email: alvaro.salinero@upm.es

La simbiosis rizobio-leguminosa es altamente específica. La translocación de proteínas denominadas efectores desde el citoplasma bacteriano a la célula vegetal es un elemento relacionado con dicha especificidad. Los efectores pueden ser translocados a través de diferentes sistemas de secreción. El análisis de genomas de rizobios ha permitido identificar en algunos la presencia de sistemas de secreción de tipo VI (T6SS). El T6SS tiene como componente principal una nanoestructura similar a las que utilizan los bacteriófagos¹ para inyectar su ADN y que las bacterias usan para secretar proteínas. Los genes implicados en la formación de T6SS están agrupados y los que codifican para componentes estructurales del sistema presentan mayor grado de conservación entre rizobios y frente a otras bacterias en comparación a los genes que codifican para efectores y reguladores del sistema. En nuestro grupo se está estudiando el T6SS de *Rhizobium etli* bv mimosae Mim1² aislada de nódulos de *Mimosa affinis* y capaz de nodular además *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena leucocephala*.

La cepa Mim1 contiene una agrupación de 28 genes en el plásmido f no simbiótico, relacionados con la formación de un T6SS, presentando una organización similar a la descrita en *Agrobacterium tumefaciens* C58³ que consiste en dos operones divergentes. Se ha descrito para varios microorganismos que cuando el T6SS está activo, las proteínas Hcp y VgrG que forman parte del aparato de secreción pueden detectarse en el medio extracelular³. Los genes que codifican proteínas estructurales en las dos bacterias presentan una gran similitud, así Hcp muestra un 94% de identidad entre ambas permitiendo que los anticuerpos que detectan Hcp de *Agrobacterium*³ también reaccionen con Hcp de Mim1. Utilizando anticuerpos contra Hcp de *Agrobacterium* se ha identificado esta proteína en el medio extracelular de cultivos de Mim1 en fase estacionaria y débilmente en fase exponencial. También se ha demostrado su presencia en nódulos de judía y en cultivos crecidos en presencia de exudados de *L. leucocephala*, *P. vulgaris* y *Pisum sativum*. Además, con el fin de conocer en qué condiciones se activa el T6SS de Mim1, se analizó una región de ADN presumiblemente promotora comprendida entre las dos agrupaciones de genes orientados de forma divergente de Mim1. Esta región se fusionó transcripcionalmente a un gen β -gal delator sin promotor del vector pMP220 en las dos posibles orientaciones, una de las orientaciones (P1) controlaría la expresión de genes como *hcp* y posibles efectores y la otra (P2) de otros genes estructurales. Los resultados mostraron que ambas orientaciones se expresaban a altas DO₆₀₀ (0,8-1) aunque los valores de P1 fueron entre dos y tres veces superiores a los de P2. Sin embargo a bajas DO₆₀₀ (0,1-0,2) la actividad de P1 se redujo a la mitad y la de P2 a niveles del control sin promotor.

Con el objetivo de conocer el papel del T6SS en simbiosis se han realizado 3 mutantes que afectan a genes estructurales del T6SS de Mim1, uno en el gen *hcp*, otro en *tssM* y el tercero es una delección de todos los genes presumiblemente dependientes de P2. Se examinó el fenotipo producido en *P. vulgaris* y *L. leucocephala* y se observó que los tres mutantes produjeron nódulos blancos y plantas con un porte similar a plantas no inoculadas, con menor tamaño que las inoculadas con la cepa parental y con un color más amarillento.

En este trabajo se ha mostrado por primera vez que la presencia de un T6SS en rizobios tiene un efecto beneficioso en la simbiosis con varios hospedadores. En estos momentos se está trabajando en la caracterización de posibles efectores.

Referencias.

1. Records AR. 2011 The type VI secretion system: a multipurpose delivery system with a phage-like machinery. *Mol Plant Microbe Interact* **24**: 751-757.
2. Rogel MA *et al.* 2014. Genomic basis of symbiovar mimosae in *Rhizobium etli*. *BMC Genomics* **15**: 575
3. Wu, HY *et al.* 2012. Acid-induced type VI secretion system is regulated by ExoR-ChvG/ChvI signaling cascade in *Agrobacterium tumefaciens*. *PLoS Pathog* **8**: 1-18

Agradecimientos.

Agradecemos a Ana Bautista y a Chendo García su ayuda en la realización de los experimentos y con el material de invernadero. Este trabajo está financiado por el MINECO (Ref.: BIO2013-43040) (JMP) y por la UPM (AL16-PID-06) (LR).