

Análisis de la adaptación de la fase endosimbiótica de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* a diferentes hospedadores

M. Ballesteros, D. Durán, D. Domínguez, M. Albareda, J. Palacios.

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP UPM-INIA), Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid, y Departamento de Biotecnología-Biología Vegetal, E.T.S. de Ingeniería Agronómica, Agroalimentaria y de Biosistemas, Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid.

E-mail: marta.ballesterosg@alumnos.upm.es

Los rizobios son alfa-proteobacterias capaces de infectar las raíces de las leguminosas e inducir en las mismas la formación de un nuevo órgano, el nódulo radicular. En dicho nódulo las células bacterianas, diferenciadas en bacteroides especializados en la fijación de nitrógeno, están rodeadas de una membrana peribacteroidal a través de cual la planta controla el intercambio de nutrientes hacia y desde el bacteroide. La adaptación de las bacterias al estilo de vida simbiótico es el resultado de un proceso de co-evolución entre ambos socios en el que se produce el intercambio de fuentes carbonadas y nitrógeno fijado en forma de amonio. En el proceso de establecimiento de la simbiosis se han descrito compuestos de diversa naturaleza química (flavonoides, lipoquitooligosacáridos, EPS) que median un reconocimiento específico entre el rizobio y la leguminosa.¹ Sin embargo, el intercambio de señales no termina con la formación del nódulo. El funcionamiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa supone el ajuste metabólico de ambos componentes simbióticos en proceso cuyos detalles aún se desconocen. Uno de los objetivos de nuestro laboratorio se centra en el estudio de la adaptación de *Rhizobium* a la simbiosis analizando cómo la bacteria responde al ambiente nodular proporcionado por la planta. Recientemente se ha descrito que en el caso de las leguminosas que inducen nódulos indeterminados (con actividad meristemática persistente) como *Medicago*, *Pisum*, o *Vicia*, la planta envía al bacteroide una batería de múltiples péptidos denominados NCR (Nodule-specific Cystein-Rich), de los que no se conoce la función concreta, aunque se ha demostrado que algunos de ellos son capaces de inducir modificaciones en células en cultivo similares a las descritas en bacteroides (inhibición de la división celular, endorreduplicación y alteraciones en la permeabilidad de la membrana).² La hipótesis actual es que la acción combinada de los NCR controla parcial o totalmente la fisiología de la bacteria induciendo su diferenciación en bacteroide y convirtiéndole en algo similar a un “esclavo metabólico” cuya función esencial es la fijación de nitrógeno para su aporte a la planta, interfiriendo con múltiples procesos fisiológicos. En el caso de rizobios capaces de establecer simbiosis con distintas leguminosas, como es el caso de *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* con *Pisum*, *Lens*, *Vicia* y *Lathyrus*, es de esperar que los bacteroides inducidos en cada planta encuentren un hábitat intracelular distinto si cada planta aporta un complemento de péptidos diferente. En esas condiciones el estudio de la respuesta de la bacteria a cada uno de esos hábitats podría aportar información relevante sobre los caracteres que permiten la adaptación de *Rhizobium* al estilo de vida intracelular en los nódulos de las leguminosas.

En este trabajo se trata de evaluar la importancia de caracteres de adaptación al hospedador en la asociación simbiótica entre *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* (*Rlv*)

y plantas leguminosas. Para ello se ha realizado la comparación de los perfiles proteómicos de células endosimbióticas de *Rlv* UPM791 inducidas en nódulos de lenteja (*Lens culinaris*) y guisante (*Pisum sativum*). Dichos perfiles se obtuvieron mediante análisis LC-MS de extractos de bacteroides, complementado con marcaje diferencial empleando la metodología iTRAQ. Este análisis ha revelado la existencia de diferencias en la expresión de un número significativo de proteínas codificadas en distintas partes del genoma bacteriano. Entre estas proteínas se han identificado proteínas de respuesta a estrés, un regulador transcripcional de tipo GntR, y otras proteínas que podrían tener un papel en el metabolismo de C/N en el bacteroide. Estos datos sugieren que las bacterias encuentran ambientes distintos en distintos hospedadores induciendo respuestas de adaptación diferenciales.

Dos de las proteínas identificadas, denominadas DABA y AMYDO, se encuentran codificadas en el plásmido simbiótico de la bacteria y se expresan a un nivel significativamente superior en guisante respecto a lenteja. La primera proteína citada es similar a una diaminobutirato 2-oxoglutarato transaminasa. Esta enzima podría intervenir en rutas metabólicas de síntesis y/o utilización de poliaminas como la 5-hidroxiectoína y la ectoína para dar L-aspartato, utilizando los anillos como fuente alternativa de nitrógeno y carbono, en una ruta posiblemente ligada a la protección contra el estrés osmótico del medio.³ La segunda proteína está anotada como una urea amido-liasa y se ha identificado en la misma un motivo GRASP de unión a ATP, aunque no tenemos más información sobre su posible función. Se está procediendo a la creación de mutantes defectivos en cada uno de estos dos genes en *Rlv* UPM791 con el fin de comparar el efecto de esas proteínas sobre el fenotipo simbiótico con cada una de las leguminosas. Se evaluará también el crecimiento de los mutantes en sustratos cuya degradación podría depender de las proteínas analizadas. Los resultados obtenidos se presentarán y discutirán en la reunión.

Referencias.

1. Downie JA. 2010. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 150-170.
2. Kondorosi E, Mergaert P & Kereszt A. 2013. A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annu Rev Microbiol* **67**: 611-628.
3. Schulz A *et al.* 2016. Feeding on compatible solutes: A substrate-induced pathway for uptake and catabolism of ectoines and its genetic control by EnuR. *Environ Microbiol* DOI: 10.1111/1462-2920.13414.

Agradecimientos.

Este trabajo fue financiado con fondos del Proyecto SYMBIOSIGNAL (MINECO BIO13-4043-P).