



ALGUNOS RIZOBIOS VAN ARMADOS PARA LUCHAR CONTRA OTRAS BACTERIAS Y PARA INTERACCIONAR CON LEGUMINOSAS

Valle, Daniel; Salinero, Álvaro; Pacheco, Alba
Tutor: Rey, Luis

Departamento de Biotecnología y Biología Vegetal (E.T.S. Ingeniería Agronómica, Alimentaria y de Biosistemas) y Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP). Universidad Politécnica de Madrid.
danval01@ucm.es

RESUMEN

Los rizobios son bacterias del suelo que pueden interactuar con leguminosas específicas y multiplicarse en estructuras radiculares especializadas llamadas nódulos. En los nódulos las bacterias realizan la fijación biológica de nitrógeno proporcionando una ventaja a estas plantas para crecer en medios pobres en nitrógeno. La relación entre los rizobios y las leguminosas es específica y está mediada por diferentes señales químicas intercambiadas entre los actores. Una de esas señales son proteínas llamadas efectores, que secretan las bacterias al citoplasma vegetal. Se han descritos diferentes sistemas de secreción y uno de ellos se denomina sistema de secreción tipo VI (T6SS). Los T6SS actúan como nanopistolas y pueden disparar efectores que pueden matar a otras bacterias. Este trabajo presenta la importancia del T6SS de *Rhizobium etli* Mim1, en la simbiosis con judías, leucenas y mimosas y frente a otras bacterias.

Palabras clave: Simbiosis, efector, secreción

INTRODUCCIÓN

Las relaciones entre microorganismos, y, entre éstos y plantas, son gran de relevancia en el desarrollo vegetal. En particular se puede destacar el papel de las bacterias denominadas rizobios en la agricultura por su aporte de nitrógeno a las plantas de la familia *Fabaceae* (*Leguminosae*). Los rizobios, habitantes del suelo, fijan nitrógeno atmosférico cuando se asientan en estructuras especializadas de las raíces de leguminosas llamadas nódulos. El nitrógeno es aprovechado por las plantas a cambio de proporcionar fotosintatos a la bacteria. La interacción rizobio-leguminosa es altamente específica, es decir, sólo determinados rizobios son compatibles con determinadas leguminosas. Entre los determinantes genéticos de los rizobios que intervienen en dicha compatibilidad se encontraría la secreción de proteínas desde el rizobio a la célula vegetal por un sistema de secreción denominado sistema de secreción tipo VI (T6SS). Este sistema se ha descrito inicialmente en patógenos animales y vegetales (Mougous et al., 2006, Pukatzki et al., 2006). Las proteínas que se secretan se llaman efectores y se ha demostrado que el T6SS actúa también en la competencia entre bacterias (Bernal et al., 2017). En este trabajo se presentan los resultados del papel del T6SS de *Rhizobium etli* bv mimosae Mim1 aislado de nódulos de *Mimosa affinis* y capaz de nodular además *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena leucocephala* (Rogel et al., 2014).

MATERIAL Y MÉTODOS

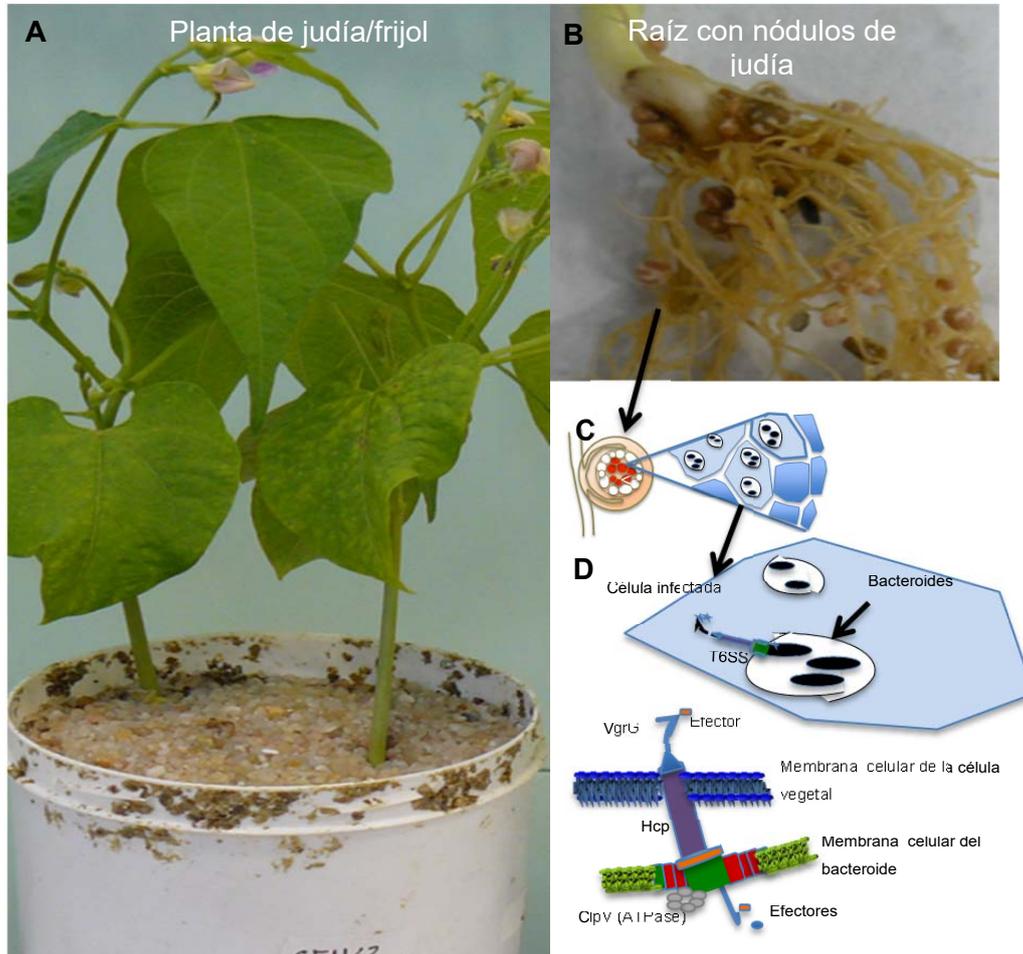
Cepas y condiciones de cultivo de plantas y microorganismos

La cepa de trabajo es *Rhizobium etli* Mim1, aislada de plantas de *Mimosa affinis* en México (Rogel et al., 2014).

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* y de *Leucaena leucocephala* se desinfectaron con lejía al 12.5% tras sumergirse un minuto en etanol para eliminar contaminaciones. Tras lavarse con abundante agua estéril se dejaron germinar 3 días a 25°C en oscuridad. Una vez germinadas dichas semillas, crecieron en invernadero en macetas de plástico (Fig. 1A) con solución Leonard (Vincent, 1970) y en condiciones bacteriológicamente controladas, añadiendo 1 ml de cultivo en fase estacionaria por semilla.

Los cultivos microbianos de rizobios se incubaron a 28°C en medio YMB (Yeast Mannitol Broth; Vincent, 1970) y TY (Tryptone Yeast; Beringer, 1974).

Figura 1. Esquema de la estructura de un T6SS en bacteroides de judía. A. Sistema de nodulación en condiciones bacteriológicamente controladas. B. Detalle de la raíz con nódulos esféricos. C. Dibujo de un corte de nódulo con células vegetales infectadas por bacteroides. D. Dibujo de un T6SS en un bacteroide con detalle estructural del T6SS.



Fuente: propia

Construcción de mutantes

La construcción del mutante en el gen *hcp* se realizó mediante la amplificación por PCR de una región interna del gen de interés que se clonó primero en el vector pCR®2.1-TOPO® y posteriormente en el vector pK18mobSac (Schäfer et al., 1994). La mutación se incorporó al genoma mediante recombinación homóloga. La delección de los genes *tssA-tagE* por un lado y del gen *tssM* por otro se realizó por amplificación de las zonas flanqueantes mediante PCR, que se combinaron con un gen de resistencia a espectinomicina que sustituyó la zona delecionada. Las construcciones se obtuvieron en el vector pCR®2.1-TOPO® y se continuó como con el mutante en *hcp*. Todos los mutantes obtenidos fueron comprobados mediante PCR.

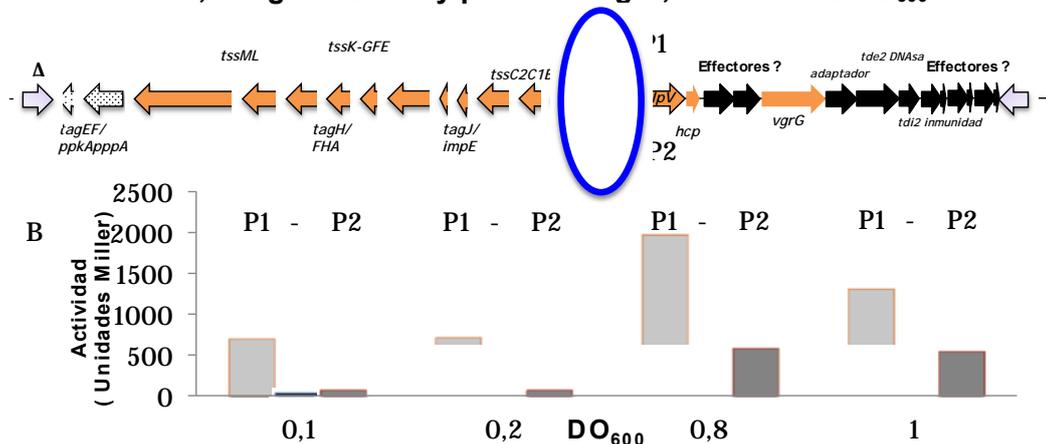
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El genoma de la cepa de estudio *R. etli* Mim1 ha sido secuenciado (Rogel et al., 2014) y tiene anotada, en el plásmido f no simbiótico, una región de ADN con 28 genes que codificarían para un T6SS (Fig. 2) y que consiste en dos operones divergentes. Muchos de estos genes codifican para elementos estructurales del sistema de secreción que es similar a la nanojeringa que utilizan algunos fagos para inyectar su ADN a bacterias



(Silverman et al., 2012). El gen *hcp* codificaría para un túbulo interno del sistema de secreción, los genes *tssBC* para la envuelta externa de la nanojeringa y otros para elementos de anclaje a las membranas (*tssAEFGJML*) (Fig. 2 A). Entre los dos operones del sistema existe una región de 230 pb que contendría una región promotora. Con objeto de estudiar las condiciones de expresión de esta región promotora se ha realizado una fusión transcripcional a un gen β -gal delator sin promotor del vector pMP220 (Spaink et al. 1987) en las dos posibles orientaciones. Una de las orientaciones (P1) controlaría la expresión de genes como *hcp* y posibles efectores, y la otra orientación (P2) la de otros genes estructurales. Los resultados mostraron que ambas orientaciones se expresaban a altas DO_{600} (0,8-1) aunque los valores de P1 fueron entre dos y tres veces superiores a los de P2. Sin embargo a bajas DO_{600} (0,1-0,2) la actividad de P1 se redujo a la mitad y la de P2 a niveles del control sin promotor. La región clonada se muestra en la Fig.2A y los datos de expresión en la Fig.2B.

Figura 2. Expresión del promotor del T6SS de *R. etli* Mim1 en medio YMB.
A. Organización génica. Con un círculo se señala la posible región promotora entre *tssA* y *clpV* fusionada al gen *lacZ* del vector pMP220 en las dos posibles orientaciones, P1 y P2. Los genes con trama de puntos son reguladores, los rayados posibles efectores y el resto genes estructurales **B. Actividades de P1 gris claro, P2 gris oscuro y pMP220 negro, a diferentes DO_{600} .**



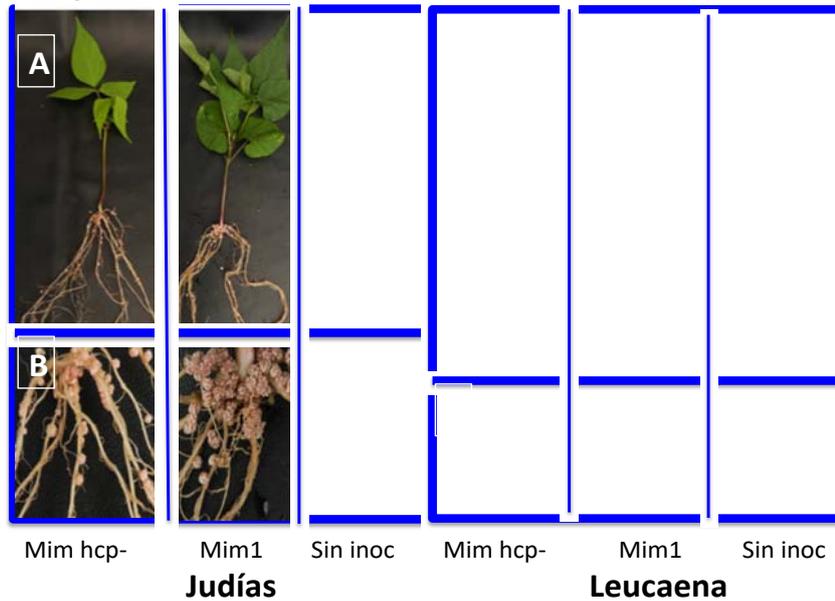
Se ha descrito para varios microorganismos que el gen *hcp* y otros genes estructurales son esenciales para formar un T6SS activo (Wu et al., 2012). Para conocer el papel del T6SS en simbiosis se han realizado 3 mutantes que afectan a genes estructurales del T6SS de Mim1, uno en el gen *hcp*, otro en *tssM* y el tercero es una delección (*tssA-tagE*) de todos los genes presumiblemente dependientes de P2. Al examinar el fenotipo producido en *P. vulgaris* y *L. leucocephala*, se observó que los tres mutantes produjeron

Tabla 1. Fenotipo simbiótico de la cepa Mim1 Hcp con judías

Inóculo	Peso de nódulos judía	Peso seco de plantas judía
Control (-)	-	0,415
Mim1	0,702	1,059
Mim1 Hcp	0,235	0,392

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. Las imágenes de judías y leucenas inoculadas con el mutante Hcp se muestran en la Fig. 3 y los datos los datos correspondientes al peso de judías y nódulos se recogen en la Tabla 1.

Figura 3 . Fenotipo simbiótico de la cepa mutante *hcp* de *R. etli* Mim1 frente a la cepa parental. Los resultados se obtuvieron a las 5 semanas post-inoculación. A. plantas completas. B. detalle de los nódulos. Sin inoc: control sin inocular.



CONCLUSIONES

El T6SS de *R. etli* Mim1 se induce en vida libre, preferentemente a altas densidades en medio YMB. En estas condiciones existe una mayor expresión de los genes transcritos en la dirección de *clpV* que los que lo hacen en la dirección opuesta como *tssA*. La presencia de un T6SS activo en *R. etli* Mim1 es importante para la nodulación efectiva de judías y leucaenas. Puede ser importante conocer el tipo de efectores de un rizobio que se seleccione para producir inoculantes efectivos y competitivos que disminuyan el uso de fertilizantes químicos.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor José Manuel Palacios por su apoyo y ayuda imprescindibles. Este trabajo está financiado por el MINECO (Ref.: BIO2013-43040) y por la UPM (AL16-PID-06).

BIBLIOGRAFÍA

Beringer, JE, 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J Gen Microbiol*84: 188-198
 Bernal, P., Allsopp, L. P., Filloux, A., & Llamas, M. A. (2017). *The ISME Journal*, doi:10.1038/ismej.2016.169
 Mougous, J.D., Cuff, M.E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C.A., Goodman, A.L., Joachimiak, G., Ordoñez, C.L., Lory, S. and Walz, T., 2006. *Science*, 312(5779), pp.1526-1530.
 Pukatzki S, Ma AT, Sturtevant D, Krastins B, Sarracino D, Nelson WC, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. 2006 PNAS. 103:1528-33.
 Rogel, MA, Bustos P, Santamaría, RI., González, V., Romero, D., Cevallos, M.Á., Lozano, L., Castro-Mondragón, J., Martínez-Romero, J., Ormeño-Orrillo, E. and Martínez-Romero, E 2014. *BMC Genomics* 15:575
 Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G. and Pühler A. 1994. *Gene*, 145: 69-73.
 Silverman J.M., Brunet Y.R., Cascales E. and Mougous J.D. 2012. *Annu. Rev. Microbiol.*, 66: 453-472.
 Spaink, H.P., Okker, R.J., Wijffelman, C.A., Pees, E. and Lugtenberg, B.J., 1987 *Plant Mol Biol*, 9:27-39.
 Vincent J.M. 1970. *IBP Handbook*. Blackwell, Oxford, UK.
 Wu, Chih-Feng, Jer-Sheng Lin, Gwo-Chyuan Shaw, and Erh-Min Lai. 2012. *PLoS Pathog.* 8:1-18