

Interacciones beneficiosas entre plantas de interés agrícola y microorganismos rizosféricos

Francisco Javier López Baena, José María Vinardell González, Francisco Javier Ollero Márquez, José Enrique Ruiz-Sainz y María del Rosario Espuny Gómez

Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.
Avenida de Reina Mercedes, 6. 41012-Sevilla

jlopez@us.es, jvinar@us.es, fjom@us.es, rsainz@us.es, espuny@us.es



Foto de grupo. Miembros del grupo de investigación de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla junto con las investigadoras visitantes An Qi y Shi Jie de la Academia de Ciencias de Heilongjiang (China).

Desde hace más de 30 años se vienen estudiando en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla las interacciones beneficiosas entre microorganismos del suelo y plantas de interés agrícola. Estos estudios se han centrado sobre todo en la simbiosis entre rizobios y leguminosas. Como consecuencia de esta simbiosis se forman unas estructuras, denominadas nódulos, en las raíces de la planta donde las bacterias fijan nitrógeno atmosférico (fenómeno comúnmente denominado como fijación biológica del nitrógeno).

Actualmente existen diversas líneas de investigación en nuestro Departamento: a) la comunicación dependien-

te de *quorum sensing* en la interacción beneficiosa planta-bacteria y la diversidad de los rizobios de ambientes sometidos a estrés para su aplicación en la recuperación o mejora de áreas para cultivos agrícolas, b) estudios genómicos y transcriptómicos de *Sinorhizobium fredii* HH103, c) estudios genómicos y transcriptómicos de *Rhizobium tropici* CIAT899, d) estudio del papel de los polisacáridos de superficie de *S. fredii* HH103 en la simbiosis con la soja, con la planta modelo *Lotus japonicus* y con *L. burtii* y e) estudio del papel del sistema de secreción de tipo 3 en la simbiosis entre *S. fredii* HH103 y diversas leguminosas hospedadoras.

Los investigadores asociados a estas líneas de investigación son María del Rosario Espuny, Ramón Bellogín, María Teresa Cubo, Francisco Javier López-Baena, Francisco Javier Ollero, Francisco Pérez-Montaño, Ana María Buendía-Clavería, José Enrique Ruiz-Sainz y José María Vinardell, los investigadores posdoctorales Juan Carlos Crespo-Rivas e Irene Jiménez-Guerrero, los investigadores en periodo de formación Cynthia Alias-Villegas, Pablo del Cerro, Sebastián Acosta-Jurado y Pilar Navarro-Gómez, la gestora de proyectos Lorena González y las técnicas de laboratorio Nuria Madinabeitia y Rocío Gutiérrez.

La línea de investigación liderada por la Dra. Espuny se centra, por un lado, en el estudio de los sistemas de comunicación entre bacterias y entre bacterias y plantas y, por otro lado, en el estudio de la biodiversidad de rizobios asociados a leguminosas sometidas a estrés. Uno de los mecanismos de comunicación entre las bacterias rizosféricas y de éstas con las plantas es el que emplea pequeñas moléculas extracelulares difusibles que, una vez llegan a una concentración extracelular umbral, son percibidas intracelularmente actuando como reguladores de la transcripción. Este fenómeno, conocido como percepción del quórum o *quorum sensing*, permite regular actividades transcendentales para el correcto establecimiento de procesos que necesitan un número mínimo de individuos. De esta forma se regulan procesos fundamentales durante la colonización y la infección, como son la producción de polisacáridos extracelulares, la formación de biopelículas o la transferencia de plásmidos. En nuestro Departamento se estudia la naturaleza de las señales producidas por algunas estirpes de *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, así como la influencia de los flavonoides inductores de los genes de nodulación sobre la expresión de los genes de síntesis y la producción de esas señales (Pérez-Montaño *et al.*, 2011). Además, hemos detectado la presencia en los exudados de semilla y de raíz de plantas de judía y de arroz de unas moléculas de naturaleza aún desconocida que imitan a las acil-homoserina lactonas o AHL (*AHL-mimics*), uno de los tipos de moléculas implicadas en el QS más extendidas entre las bacterias Gram negativas. Se ha comprobado que estas *AHL-mimics* tienen un efecto directo sobre la capacidad de desarrollo de biopelículas por bacterias simbióticas de leguminosas y por otras que pueden ser percibidas como presuntas patógenas por el arroz (Pérez-Montaño *et al.*, 2013). Por otro lado, la necesidad de aumentar la productividad de los cultivos agrícolas en suelos sometidos a factores adversos como la salinidad, la acidez o la presencia de metales pesados ha propiciado el estudio de los rizobios que establecen una simbiosis efectiva con leguminosas propias de esos ambientes. Se ha determinado que la leguminosa *Medicago marina*, que crece sobre las dunas de playas y en zonas de marismas del sur de España, establece simbiosis con bacterias de la especie *Ensifer* (*Sinorhizobium meliloti*) y, menos frecuentemente, con *E. medicae*. Además, se ha comprobado que estos simbiosiontes son tolerantes a concentraciones relativamente altas de NaCl, a altas temperaturas y a ciertos metales pesados como el Cu, Zn, Cd y Ni (Alias-Villegas *et al.*, 2015). Algunos de estos aisla-

mientos se han seleccionado para estudiar la presencia de genes que codifiquen sistemas de eliminación de metales pesados del interior celular. El objetivo sería el de disponer de una colección de rizobios con capacidad de establecer relaciones simbióticas efectivas en condiciones adversas con leguminosas de interés agrícola para la recuperación de suelos de cultivo o mejorar su productividad.

La línea de investigación liderada por el Dr. Vinardell se centra en estudios genómicos y transcriptómicos enfocados en la simbiosis entre *S. fredii* HH103 y la soja. *S. fredii* posee un rango de nodulación extremadamente amplio (más de 100 géneros de leguminosas) que incluye tanto plantas formadoras de nódulos determinados, como la soja, como formadoras de nódulos indeterminados, como *Glycyrrhiza uralensis* (Margaret *et al.*, 2011). Las tres estirpes más estudiadas de *S. fredii* son NGR234, USDA257 y HH103. De todas ellas existe información genómica, y muy recientemente hemos publicado la anotación manual del genoma de HH103, compuesto por 7 replicones diferentes (Vinardell *et al.* 2015). Una interesante diferencia entre estas tres estirpes es su diferente fenotipo simbiótico con la soja, una de las plantas más importantes a nivel agronómico mundial: NGR234 es Fix⁻, USDA257 solo es Fix⁺ con sojas salvajes y variedades asiáticas, mientras que HH103 es Fix⁺ tanto con variedades asiáticas como americanas (mejoradas) de esta leguminosa.

Recientes estudios transcriptómicos (RNA-seq y qPCR) han puesto de manifiesto que alrededor de 100 genes de *S. fredii* HH103 están regulados por flavonoides. Estos genes pueden englobarse en tres grandes grupos: aquellos que dependen de una caja de nodulación, aquellos que dependen de un promotor *tts*, y aquellos que carecen de dichas secuencias promotoras. Muchos de estos genes aún no han sido caracterizados en ningún rizobio. En la actualidad estamos analizando el papel de diversos elementos reguladores (*nodD1*, *nodD2*, *nolR*, *ttsI*, *syrM*) en la expresión de dichos genes. Asimismo estamos interesados en caracterizar el posible papel simbiótico de aquellos genes que hasta la fecha no han sido estudiados en los rizobios.

La línea de investigación liderada por el Dr. Ollero se centra también en el análisis del genoma y el transcriptoma de otro rizobio, *R. tropici* CIAT899. CIAT899 es una estirpe peculiar ya que su plásmido simbiótico contiene 5 copias del gen regulador *nodD* y 3 copias del gen *nodA* (Ormeño-Orillo *et al.*, 2012). Además, es capaz de sintetizar factores de nodulación en respuesta a flavonoides y también en presencia de sal, siendo esta inducción con sal independiente del gen regulador *nodD1*, que sí es el responsable de la inducción de los factores de nodulación en presencia de flavonoides. En estudios previos (del Cerro *et al.*, 2015) se ha demostrado que la mutación en el gen regulador *nodD1* que activa la caja de nodulación adyacente al operón *nodA1BCSUIJHPQ* no impide que la bacteria forme nódulos fijadores de nitrógeno en judía, si bien se induce un menor número de nódulos en esta planta. En cambio, este mutante deja de nodular otras leguminosas hospedadoras como *Leucaena leucocephala* o *Macroptilium atropurpureum*. La mutación en el gen *nodD2* disminuye el número de nódulos

en judía, pero no afecta a la nodulación en *L. leucocephala* y *M. atropurpureum*. Se han obtenido mutantes en los otros genes *nodD* y los estudios realizados indican que el gen *nodD4* parece ser un inhibidor, ya que su mutación hace que la bacteria sintetice una mayor cantidad de factores de nodulación (del Cerro et al., 2015).

Se han llevado a cabo estudios transcriptómicos de CIAT899 en respuesta al flavonoide apigenina y al estrés salino que indican claramente que los genes de nodulación se transcriben a niveles similares en estas dos condiciones de cultivo. En estos estudios se han encontrado genes de función desconocida que están regulados por una caja de nodulación y cuya función en el proceso simbiótico se analizará en estudios posteriores.

En la actualidad se está estudiado el papel que juegan los tres genes *nodA* presentes en el plásmido simbiótico y se está estudiando qué gen es el responsable de la inducción de los factores de nodulación en presencia de 300 mM de NaCl.

Los trabajos de investigación liderados por el Dr. Ruiz-Sainz se centran en el estudio del efecto de diversas mutaciones en genes involucrados en la producción de polisacáridos superficiales y factores de nodulación sobre las propiedades simbióticas de *S. fredii* HH103 con *L. japonicus* y *L. burtii*. También se está estudiando la capacidad simbiótica de *S. fredii* HH103 con una colección de sojas salvajes, ancestros de las sojas usadas en la agricultura moderna.

Finalmente, la línea de investigación liderada por el Dr. López-Baena se centra en el estudio del papel del sistema de secreción de tipo 3 (T3SS) de *S. fredii* HH103 en la simbiosis con diversas leguminosas hospedadoras. El T3SS es un sistema de secreción de proteínas muy especializado utilizado para secretar proteínas, denominadas efectores (o proteínas Nop en el caso de los rizobios), directamente al interior de la célula hospedadora, donde realizan su función. Estos efectores suprimen las respuestas de defensa de la planta para promover la infección y así asegurar la supervivencia de la bacteria dentro del hospedador.

Mediante diversas técnicas (espectrometría de masas, inmunodetección y RNA-seq), se ha determinado por primera vez en un rizobio el conjunto de efectores secretados a través del T3SS. Si bien algunos de estos efectores son similares a efectores presentes en fitopatógenos, otros son específicos de rizobios. Solo algunos de estos efectores han sido caracterizados bioquímicamente y sus dianas en la célula vegetal y su papel en la simbiosis son aún desconocidos. Nuestro grupo de investigación ha demostrado que el T3SS de HH103 está implicado en la supresión de las respuestas de defensa para asegurar una correcta nodulación de las plantas de soja (Jiménez-Guerrero et al., 2015). Actualmente estamos caracterizando todos los efectores de

HH103 e intentando determinar su función en la simbiosis, centrándonos sobre todo en aquellos efectores que carecen de homólogos en patógenos de animales o plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alías-Villegas C, Cubo MT, Lara-Dampier V, Bellogín RA, Camacho M, Temprano F, Espuny MR. (2015). Rhizobial strains isolated from nodules of *Medicago marina* in southwest Spain are abiotic-stress tolerant and symbiotically diverse. *Syst Appl Microbiol* 38: 506-14.
- del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF, Marks B, Pérez-Montaño F, Rodríguez-Carvajal MA, Gil-Serrano A, Megías M, Ollero FJ, Hungria MA. (2015). Regulatory *nodD1* and *nodD2* genes of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 and their role in early steps of molecular signaling and host nodulation. *BMC Genomics*, 16: 251.
- del Cerro P, Rolla-Santos AAP, Gomes DF, Marks BM, Espuny MR, Rodríguez-Carvajal MA, Soria-Díaz ME, Nakatani AS, Hungria M, Ollero FJ, Megías M. (2015). Opening the «black box» of *nodD3*, *nodD4* and *nodD5* of *Rhizobium tropici* CIAT899. *BMC Genomics* 16: 864.
- Jiménez-Guerrero I, Pérez-Montaño F, Monreal JA, Preston GM, Fones H, Vioque B, Ollero FJ, López-Baena FJ. (2015). The *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* HH103 type 3 secretion system suppresses early defense responses to effectively nodulate soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 28: 790-9.
- Margaret I, Becker A, Blom J, Bonilla I, Goesmann A, Göttfert M, Lloret J, Mittard-Runte V, Rückert C, Ruiz-Sainz JE, Vinardell JM, Weidner S. (2011). Symbiotic properties and first analyses of the genomic sequence of the fast growing model strain *Sinorhizobium fredii* HH103 nodulating soybean. *J Biotechnol* 155: 11-19.
- Ormeño-Orrillo E, Menna P, Almeida LG, Ollero FJ, Nicolás FM, Pains Rodrigues E, Shigeyoshi Nakatani A, Silva Batista JS, Oliveira Chueire LM, Souza RC, Ribeiro Vasconcelos AT, Megías M, Hungria M, Martínez-Romero E. (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* 13: 735.
- Pérez-Montaño F, Guasch-Vidal B, González-Barroso S, López-Baena FJ, Cubo T, Ollero FJ, Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MA, Bellogín RA, Espuny MR. (2011). Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of N-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Res Microbiol* 162: 715-23.
- Pérez-Montaño F, Jiménez-Guerrero I, Contreras Sánchez-Matamoros R, López-Baena FJ, Ollero FJ, Rodríguez-Carvajal MA, Bellogín RA, Espuny MR. (2013). Rice and bean AHL-mimic quorum-sensing signals specifically interfere with the capacity to form biofilms by plant-associated bacteria. *Res Microbiol* 164: 749-60.
- Vinardell JM, Acosta-Jurado S, Göttfert M, Zehner S, Becker A, Baena-Ropero I, Blom J, Crespo-Rivas JC, Goesmann A, Jaenicke S, Krol E, McIntosh M, Margaret I, Pérez-Montaño F, Schneiker-Bekel S, Serrania J, Szczepanowski R, Buendía-Clavería AM, Lloret J, Bonilla I, Pühler A, Ruiz-Sainz JE, Weidner S. (2015). The *Sinorhizobium fredii* HH103 genome: a comparative analysis with *S. fredii* strains differing in their symbiotic behaviour with soybean. *Mol Plant Microbe Interact* 28: 811-24.