

Mecanismos de adaptación de *P. fluorescens* F113 al ambiente rizosférico

Rafael Rivilla y Marta Martín

Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid

rafael.rivilla@uam.es



Foto de grupo. Grupo Rizofera. De izquierda a derecha: Irene Baena, Candela Muriel, Miguel Redondo-Nieto, Rafael Rivilla, Marta Martín, Francisco Martínez-Granero, María Sánchez-Contreras, Daniel Garrido-Sanz, Javier Lloret y Eva Arrebola.

La rizosfera es un nicho ecológico complejo en el que gracias a la presencia de la planta se desarrollan multitud de microorganismos en mayor proporción que en el suelo no rizosférico. Muchas de las bacterias que viven asociadas a la rizosfera de las plantas (rizobacterias) son capaces de mejorar el estado fisiológico de las mismas (PGPRs de *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) y por tanto tienen diversos usos biotecnológicos en sistemas integrados planta/microorganismo. Las pseudomonas fluorescentes son un grupo de rizobacterias que engloban especies utilizadas en biocontrol de patógenos de plantas y también en biorremediación de suelos contaminados. En nuestro laboratorio trabajamos con la rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* F113 que fue aislada de la rizosfera de remolacha y se utiliza como agente de control biológico gracias a que entre otros metabolitos secundarios produce diacetilfluoroglucinol (DAPG) un potente antifúngico de amplio espectro. Además,

la hemos modificado genéticamente mediante la introducción de los genes *bph* que codifican las enzimas de degradación de PCBs (Villacieros *et al.*, 2005; Aguirre de Cárcer *et al.*, 2007 a, b). En cualquier caso, la eficacia de las aplicaciones biotecnológicas de las pseudomonas depende de su capacidad para colonizar competentemente la rizosfera. En nuestro laboratorio hemos demostrado que el incremento de las cualidades competitivas de *P. fluorescens* F113 durante el proceso de colonización de la raíz, mejora sustancialmente el biocontrol ejercido por F113 en dos patosistemas diferentes (Barahona *et al.*, 2011).

P. fluorescens F113 es una bacteria que coloniza muchas plantas de interés agrícola y está siendo utilizada como bacteria modelo en estudios de colonización (Villacieros *et al.*, 2003; Capdevila *et al.*, 2004; Barahona *et al.*, 2010). Hemos observado la importancia de tres caracteres para que F113 mantenga su competitividad y persista durante un

cierto tiempo en un nicho ecológico cambiante como es el rizosférico. Estos son: la variación de fase, el movimiento y la formación de biopelículas. Cuando *P. fluorescens* F113 coloniza la raíz de la planta sufre un fenómeno de diversificación de la población en distintos morfotipos denominado variación de fase (Sánchez-Contreras *et al.*, 2002). La aparición de las variantes de fase está ocasionada por la acción de dos recombinasas específicas de sitio (Martínez-Granero *et al.*, 2005) y hemos observado que presentan características de hipermovilidad (Martínez-Granero *et al.*, 2006). Esta es la razón por la que comenzamos a estudiar la regulación del movimiento en F113. En un principio centramos nuestro trabajo en la regulación de la síntesis del aparato flagelar típico de *Pseudomonas* (Capdevila *et al.*, 2004; Redondo-Nieto *et al.*, 2008; Navazo *et al.*, 2009) pero la secuenciación del genoma de F113 reveló que esta cepa tenía además de los genes que codifican el aparato flagelar de *Pseudomonas*, un conjunto de genes que codificaban un segundo aparato flagelar cuya secuencia es más similar a la de los genes del flagelo de *Azotobacter* (Redondo-Nieto *et al.*, 2012 y 2013). Este segundo flagelo no se expresa en condiciones de laboratorio; sin embargo, se selecciona durante el proceso de colonización de la rizosfera ya que hemos observado su expresión en las variantes de fase. La regulación de la síntesis de este segundo aparato flagelar también ha sido estudiada y pensamos que tiene gran importancia en el aumento de competitividad por parte de F113 durante el proceso de colonización de la raíz. Además de estos mecanismos de regulación, la movilidad depende de la quimiotaxis. Hemos encontrado que en F113 y otras cepas relacionadas existen tres sistemas de quimiotaxis (Redondo-Nieto *et al.*, 2013), frente a los dos habituales en otras pseudomonas, como *P. aeruginosa*. El análisis de mutantes afectados en cada uno de estos tres sistemas nos ha permitido demostrar que los tres son funcionales e independientes y que son necesarios para la colonización competitiva de la rizosfera (Muriel *et al.*, 2015). Por otro lado, también hemos analizado los mecanismos de transducción de señal que intervienen en la regulación de la función flagelar (Martínez-Granero *et al.*, 2012; Martínez-Granero *et al.*, 2014a). En este sentido hemos encontrado que la molécula señal diGMPc juega un papel muy importante. Los niveles de diGMPc definen estilos de vida bacterianos. Cuando sus niveles son altos, la bacteria tiene una tendencia al estilo de vida sésil hacia la formación de biopelículas. Por el contrario, cuando los niveles de diGMPc son bajos se favorece el estilo de vida móvil. Las diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas son las enzimas encargadas de mantener los niveles de diGMPc intracelulares en respuesta a las condiciones ambientales. El genoma de F113 cuenta con más de 30 proteínas que contienen los dominios característicos de estas enzimas. Hemos observado la implicación de algunas de ellas en los mecanismos de transducción de señal que regulan el movimiento en F113 (Navazo *et al.*, 2009; Martínez-Granero *et al.*, 2012 y 2014a). También hemos analizado la existencia de una proteína, que cuenta con un dominio sensor de diGMPc (Martínez-Granero *et al.*, 2014a). Esta proteína interviene en la regulación de la

transición entre estilo de vida sésil y móvil e interacciona con el motor flagelar en respuesta a los niveles de diGMPc (Martínez-Granero *et al.*, 2014a).

El análisis de la regulación del movimiento y la función flagelar ha permitido observar la existencia en F113 de una red muy compleja de señalización en respuesta al ambiente rizosférico. Esta red presenta un nodo central que conecta todas las respuestas y que está formado por el factor sigma AlgU y la proteína AmrZ (Martínez-Granero *et al.*, 2012). Por ello, llevamos a cabo una inmuno-precipitación de cromatina (ChIP-seq) utilizando la proteína AmrZ como cebo y la posterior secuenciación masiva ha revelado la existencia de al menos 154 genes que interaccionan con AmrZ (Martínez-Granero *et al.*, 2014b). Muchos de los genes regulados por AmrZ han sido descritos como proteínas implicadas en la adaptación al ambiente y entre ellos se encuentran muchas de las que intervienen en la homeostasis del hierro y en la síntesis y degradación del diGMPc. Resultados similares han sido obtenidos para la proteína AmrZ de *Pseudomonas aeruginosa* (Jones *et al.*, 2014). Los resultados de ambos grupos muestran que AmrZ es uno de los reguladores globales más importantes que intervienen en las respuestas de las pseudomonas a los cambios ambientales.

El conocimiento adquirido sobre cómo la rizobacteria *P. fluorescens* F113 se adapta al ambiente rizosférico nos ha permitido diseñar modificaciones que han aumentado su capacidad de colonización competitiva y sus cualidades como bacteria promotora del crecimiento de las plantas. Por otro lado, nos permite dirigir nuestra búsqueda de nuevos inoculantes bacterianos naturales que contengan estos caracteres de interés con el objeto de asegurar su eficacia en aplicaciones en sistemas integrados planta microorganismo tanto para rizadorremediación como para una agricultura más sostenible.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre de Cárcer D, Martín M, Karlson U. y Rivilla R. (2007a). Change in bacterial populations and in biphenyl-dioxygenase gene diversity in a polychlorinated biphenyl-polluted soil after introduction of Willow trees for rhizoremediation. *Appl Environ Microbiol* 73: 6224-32.
- Aguirre de Cárcer D, Martín M, Mackova M, Macek R, Karlson U, Rivilla R. (2007b). The introduction of genetically modified microorganisms designed for rhizoremediation induces changes on native bacteria in the rhizosphere but not in the surrounding soil. *The ISME J.* 1: 215-23.
- Barahona E, Navazo A, Yousef-Coronado F, Aguirre de Cárcer D, Martínez-Granero F, Espionosa-Urgel M, Martín M, Rivilla R. (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* f113 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ Microbiol* 12: 3185-95.
- Barahona E, Navazo A, Martínez-Granero F, Zea-Bonilla T, Pérez-Jiménez R, Marta M. y Rivilla R. (2011). A *P. fluorescens* F113 mutant with enhanced competitive colonization ability shows improved biocontrol activity against fungal root pathogens. *Appl Environ Microbiol* 77: 5412-9.
- Capdevila S, Martínez-Granero F, Sánchez-Contreras M, Rivilla R. y Martín M. (2004). Analysis of *P. fluorescens* F113 genes implicated in flagella filament synthesis and their role in competitive root colonization. *Microbiology* 150: 3889-97.

- Jones C.J, Newsom D, Kelly B, Irie Y, Jennings L.K, Xu B, Limoli D.H, Harrison J.J, Parsek M.R, White P, Wozniak D.J. (2014). ChIP-Seq and RNA-Seq reveal an AmrZ-mediated mechanism for cyclic di-GMP synthesis and biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.* 10:e1003984.
- Martínez-Granero F, Capdevila S, Sánchez-Contreras M, Martín M, Rivilla R. (2005). Two site-specific recombinases are implicated in phenotypic variation and competitive rhizosphere colonization in *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology* 151: 975-83.
- Martínez-Granero F, Rivilla R, Martín M. (2006). Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *P. fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl Environ Microbiol* 72: 3429-34.
- Martínez-Granero F, Navazo N, Barahona E, Redondo-Nieto M, Rivilla R, Martín M. (2012). The Gac-Rsm and SadB signal transduction pathways converge on AlgU to downregulate motility in *Pseudomonas fluorescens*. *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0031765
- Martínez-Granero F, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Gonzalez de Heredia E, Baena I, Martín-Martín I, Rivilla R, Martín M. (2014a). Identification of *flgZ* as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas*. *PLoS ONE* 9: e87608.
- Martínez-Granero F, Redondo-Nieto M, Vesga P, Martín M, Rivilla R. (2014b). AmrZ is a global transcriptional regulator implicated in iron uptake and environmental adaptation in *P. fluorescens* F113. *BMC Genomics* 15: 237.
- Muriel C, Jalvo B, Redondo-Nieto M, Rivilla R, Martín M. (2015). Chemotactic motility of *Pseudomonas fluorescens* F113 under aerobic and denitrification conditions. *PLoS ONE* 10: e0132242
- Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, Martínez-Granero F, Rivilla R, Martín M. (2009). Three independent signaling pathways repress motility in *Pseudomonas fluorescens* F113. *Microbial Biotech* 2: 489-98.
- Redondo-Nieto M, Lloret J, Larenas J, Barahona E, Navazo A, Martínez-Granero F, Capdevila S, Rivilla R, Martín M. (2008). Transcriptional organization of the Region encoding the synthesis of the flagellar filament in *P. fluorescens*. *J Bacteriol* 190: 4106-9.
- Redondo-Nieto M, Barret M, Morrisey J, Germaine K, Martínez-Granero F, Barahona E, Navazo A, Sánchez-Contreras M, Moynihan J, Giddens S, Coppoolse E, Muriel C, Stiekema W, Rainey P, Dowling D, O'Gara F, Martín M, Rivilla R. (2012). Genome sequence of the biocontrol strain *P. fluorescens* F113. *J Bacteriol* doi : 10.1128/JB.06601-11
- Redondo-Nieto M, Barret M, Morrisey J, Germaine K, Martínez-Granero F, Barahona E, Navazo A, Sánchez-Contreras M, Moynihan J, Muriel C, Dowling D, O'Gara F, Martín M, Rivilla R. (2013). Genome sequence reveals that *Pseudomonas fluorescens* F113 possesses a large and diverse array of systems for rhizosphere function and host interaction. *BMC Genomics* 14:54.
- Sánchez-Contreras, M, Martín M, Villacieros M, O'Gara F, Bonilla I, y Rivilla R. (2002). Phenotypic selection and phase variation occur during alfalfa root colonization by *P. fluorescens* F113. *J. Bacteriol* 184: 1587-1596.
- Villacieros M, Power B, Sánchez-Contreras M, Lloret J, Oruezabal RI, Martín M, Fernández-Piñas F, Bonilla I, Whelan C, Dowling D, Rivilla R. (2003). Colonization behaviour of *Pseudomonas fluorescens* and *Sinorhizobium meliloti* in the alfalfa (*Medicago sativa*) rhizosphere *Plant and Soil* 251: 47- 54.
- Villacieros M, Whelan C, Mackova M, Molgaard J, Sánchez-Contreras M, Lloret J, Aguirre de Cárcer D, Oruezabal R, Bolaños L, Macek T, Karlson U, Dowling D, Martín M, Rivilla R. (2005). Polychlorinated biphenyl rhizoremediation by *P. fluorescens* F113 derivatives, using a *S. meliloti* nod system to drive *bph* gene expression. *Appl Environ Microbiol* 71: 2687-94.



Sigue a la  SEM

  

www.semicrobiologia.org