

Intercambio de nutrientes y señales en la simbiosis *Rhizobium-leguminosa*

Jose Manuel Palacios, Luis Rey, David Durán, Raquel García, Alba Pacheco, Anabel Bautista, Carmen Sánchez-Cañizares, Belen Brito, Marta Albareda, Laura Rubio-Sanz y Tomás Ruiz-Argüeso

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid, Campus de Montegancedo, 28223 Pozuelo de Alarcón, Madrid

jose.palacios@upm.es



Foto de grupo. Componentes del grupo de Asociaciones Simbióticas Planta-Microorganismo.

El grupo de Asociaciones Simbióticas Planta-Microorganismo del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas centra su trabajo en el análisis de aspectos relacionados con la síntesis de metaloenzimas y la señalización en la interacción *Rhizobium-leguminosa*. La simbiosis *Rhizobium-leguminosa* es una asociación altamente específica en la que la bacteria infecta de forma controlada a la planta, colonizando las células del córtex radicular en bacteroides capaces de fijar nitrógeno atmosférico que transfiere a la planta en forma de amonio (Fig. 1). A cambio, la planta provee a la bacteria de un hábitat protegido con acceso a sustratos carbonados en forma de ácidos orgánicos.

Los trabajos desarrollados por el grupo en los últimos años nos han permitido describir aspectos fundamentales en la ruta de biosíntesis de la hidrogenasa FeNi de *Rhizobium leguminosarum*, una metaloenzima que recicla el hidrógeno producido por la nitrogenasa en el proceso de fijación de nitrógeno. La síntesis de esta enzima requiere de la participación de un conjunto de 18 genes (*hupSLCDEFGHIJKhypABFCDEX*), muchos de ellos implicados en la síntesis y ensamblaje del cofactor metálico NiFe(CN)₂CO. Las funciones descritas recientemente por nuestro grupo se refieren a la participación de dos de los

productos génicos del clúster *hup* (HupF y HupK) como intermediarios en el proceso de ensamblaje del precursor de dicho cofactor en la subunidad estructural HupL de la enzima. HupK actúa como una proteína de andamiaje, mientras que HupF protege a HupL de la presencia de oxígeno durante el proceso de biosíntesis (Albareda *et al.*, 2012; 2014)

Por otro lado, hemos abordado el estudio del mecanismo de provisión de níquel para la síntesis de la hidrogenasa. El principal sistema de transporte está constituido por una permeasa (HupE) que actúa como un sistema altamente específico de difusión facilitada permitiendo la entrada de este elemento a favor de gradiente de concentración mantenido por la unión del catión a proteínas intracelulares (Albareda *et al.*, 2015). La homeostasis celular de este metal, tóxico a concentraciones moderadas, es mantenida en *R. leguminosarum* bv *viciae* UPM791 por la acción de sistemas de salida de cationes metálicos como el sistema DmeRF que hemos descrito recientemente (Rubio-Sanz *et al.*, 2013)

El trabajo del grupo se orienta también hacia el análisis de los sistemas de señalización planta bacteria relevantes para la simbiosis. Dicha señalización incluye efectores trasladados mediante sistemas de secreción de tipo III (T3SS)

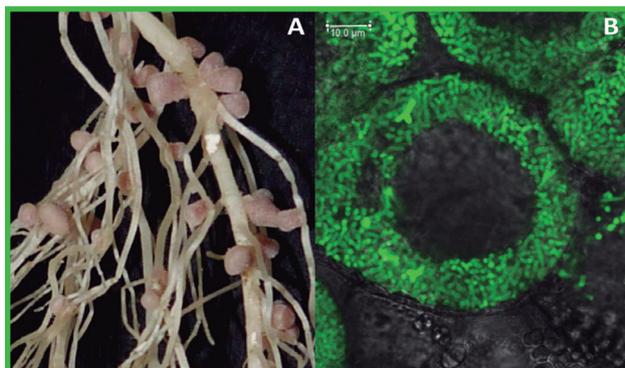


Figura 1. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. A) Nódulos inducidos en raíces de guisante (*Pisum sativum*) por la bacteria *Rhizobium leguminosarum* bv viciae (Rlv). B) Células infectadas de un nódulo como los mostrados en A con bacteroides de Rlv UPM791 marcados con GFP.

y de tipo VI (T6SS), que son capaces de exportar proteínas sintetizadas por la bacteria al citoplasma del simbionte vegetal. Hemos identificado este tipo de sistemas de secreción en varias cepas de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Resultados preliminares indican que mutantes afectados específicamente en el T3SS de *Bradyrhizobium* modifican el rango de hospedadores efectivos de dicha bacteria.

El establecimiento y funcionamiento de la fijación simbiótica de nitrógeno por esta simbiosis requiere de la proliferación de bacterias en la superficie de las raíces de la leguminosa. En dicho incremento poblacional operan las señales de *quórum sensing* que permiten un comportamiento coordinado en respuesta a la acumulación de señales de tipo acil-homoserín-lactona (AHL). Con el fin de avanzar en el conocimiento de la relevancia simbiótica de este tipo de comunicación intercelular estamos analizando el efecto de mutaciones en los dos sistemas de quórum sensing presentes en *Rhizobium leguminosarum* bv viciae UPM791. Los datos disponibles permiten deducir que uno de los sistemas es esencial para la simbiosis, y que su importancia depende de determinantes génicos presentes en plásmidos crípticos de la cepa (Sánchez Cañizares *et al.*, manuscrito en preparación).

El análisis de las funciones simbióticas nos ha permitido obtener diversas evidencias que indican que la leguminosa hospedadora es capaz de modificar el comportamiento del microsimbionte en aspectos relacionados con la expresión de la actividad hidrogenasa, el transporte de níquel e incluso la propia capacidad de fijación de nitrógeno. En uno de los proyectos de investigación actualmente en desarrollo estamos abordando el estudio de las bases moleculares de este efecto del huésped. Para ello estamos analizando mutantes que son efectivos en un huésped (*Pisum sativum*) e inefectivos en una segunda leguminosa (*Lens sculenta*), un fenotipo simbiótico inusual que hemos denominado Hse (*Host-specific symbiotic efficiency*). La complementación de estos mutantes con una genoteca genómica nos ha permitido identificar una región del cromosoma de *Rhizobium leguminosarum* posiblemente implicada en la síntesis de nuevas señales de la bacteria que permiten la regulación fina de la

especificidad en la elección de leguminosa huésped.

Un aspecto de interés en la simbiosis es el análisis de nuevos sistemas *Rhizobium*-leguminosa. En colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Juan Imperial hemos descrito la diversidad de microsimbiontes capaces de nodular de forma eficiente la leguminosa *Lupinus maría-josephae*, un endemismo recientemente descubierto en una zona del Levante español (Pascual, 2004). El análisis filogenético de las bacterias capaces de asociarse con esta leguminosa ha revelado la existencia de una elevada biodiversidad en dicho grupo (Sánchez-Cañizares *et al.*, 2011; Durán *et al.*, 2013) y ha conducido a la definición de una nueva especie de *Bradyrhizobium* (Duran *et al.*, 2014). La utilización de algunas de las cepas aisladas de suelo como inoculante en experimentos de campo ha permitido demostrar que la presencia de bacterias endosimbióticas es un factor esencial para la conservación de estas leguminosas en sus hábitats naturales (Navarro *et al.*, 2014).

Un mejor conocimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa permitirá la mejora de los sistemas de biofertilización nitrogenada que constituyen una pieza clave en la definición de estrategias para la implementación de una agricultura sostenible. El trabajo del grupo se ha financiado mediante proyectos del Ministerio de Economía y competitividad (BIO2013-43040-P a J.M.P), de la Fundación BBVA (LUPICAL a T.R.A) y del Sistema Alemán de Intercambio Académico (ref. 57050413 a L.R.).

BIBLIOGRAFÍA

- Albareda M, Manyani H, Imperial J, Brito B, Ruiz-Argüeso T, Bock A, Palacios JM. (2012). Dual role of HupF in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenase in *Rhizobium leguminosarum*. BMC Microbiol 12: 256.
- Albareda M, Pacios LF, Manyani H, Rey L, Brito B, Imperial J, Ruiz-Argüeso T, Palacios JM. (2014). Maturation of *Rhizobium leguminosarum* hydrogenase in the presence of oxygen requires the interaction of the chaperone HypC and the scaffolding protein HupK. J Biol Chem 289: 21217-29.
- Albareda M, Rodríguez A, Brito B, Ruiz-Argüeso T, Imperial J, Mandrand-Berthelot MA, Palacios J. (2015). *Rhizobium leguminosarum* HupE is a highly-specific diffusion facilitator for nickel uptake. Metallomics 7: 691-701.
- Duran D, Rey L, Navarro A, Busquets A, Imperial J, Ruiz-Argüeso T. (2014). *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-josephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. Syst Appl Microbiol 37: 336-41.
- Duran D, Rey L, Sánchez-Cañizares C, Navarro A, Imperial J, y Ruiz-Argüeso T. (2013). Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. Syst Appl Microbiol 36: 128-36.
- Navarro A, Fos S, Laguna E, Duran D, Rey L, Rubio-Sanz L, Imperial J, Ruiz-Argüeso T. (2014). Conservation of endangered *Lupinus mariae-josephae* in its natural habitat by inoculation with selected, native *Bradyrhizobium* strains. PLoS One 2014, 9:e102205.
- Pascual H. (2004). *Lupinus mariae-josephi* (Fabaceae), nueva y sorprendente especie descubierta en España. An Jard Bot Madrid 61:69-72
- Rubio-Sanz L, Prieto RI, Imperial J, Palacios JM, Brito B. (2013). Functional and expression analysis of the metal-inducible *dmeRF* system from *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. Appl Environ Microbiol 79: 6414-22.
- Sánchez-Cañizares C, Rey L, Duran D, Temprano F, Sanchez-Jimenez P, Navarro A, Polajnar M, Imperial J, Ruiz-Argüeso T. (2011). Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. Syst Appl Microbiol 34: 207-15.