

# Percepción y adaptación en bacterias durante la interacción con la planta

Emilia López Solanilla, Pablo Rodríguez-Palenzuela, José Juan Rodríguez-Herva, Saray Santamaría Hernando, Mariela José Navas Vasquez, Jean-Paul Cerna Vargas

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas (CBGP), Universidad Politécnica de Madrid-Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Pozuelo de Alarcón, Madrid, y Departamento de Biotecnología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Madrid

[emilia.lopez@upm.es](mailto:emilia.lopez@upm.es)



Foto de grupo. De izquierda a derecha: Mariela José Navas Vasquez, Pablo Rodríguez-Palenzuela, Saray Santamaría Hernando, Emilia López Solanilla, José Juan Rodríguez-Herva y Jean-Paul Cerna Vargas.

El grupo «Bacterias Fitopatógenas» del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas está liderado por los doctores Emilia López Solanilla y Pablo Rodríguez Palenzuela. Las líneas de investigación en curso se desarrollan a través de aproximaciones mixtas en las que se combinan los datos experimentales con los estudios a nivel bioinformático.

Durante los últimos años el interés del grupo se ha centrado en el estudio de los mecanismos de entrada y adaptación al huésped durante los estadios iniciales de la infección bacteriana. Un aspecto clave durante el ciclo de vida de una

bacteria fitopatógena es la capacidad de adaptarse a los cambios que suceden en el ambiente que le rodea. Estos cambios van desde aquellos a los que se ve sometida en los estadios previos a la infección (cambios de temperatura, luz, cantidad de oxígeno, cantidad de nutrientes...) hasta el cambio de ambiente relacionado con el proceso de entrada al interior de la planta huésped (adaptación al ambiente del apoplasto, incluida la escasez de nutrientes y la presencia de sustancias antimicrobianas). El éxito de la infección residirá, por tanto, en la capacidad de percibir las señales del ambiente (físicas y químicas) y en la reprogramación

de la expresión génica dirigida a enfrentar las condiciones cambiantes.

El estudio de esos aspectos los llevamos a cabo en dos bacterias fitopatógenas modelo: la bacteria necrotrofa *Dickeya dandantii* 3937 (Dd3937), causante de la podredumbre blanda en un gran número de especies vegetales y *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 (PsPto), bacteria hemibiotrofa que produce la peca del tomate.

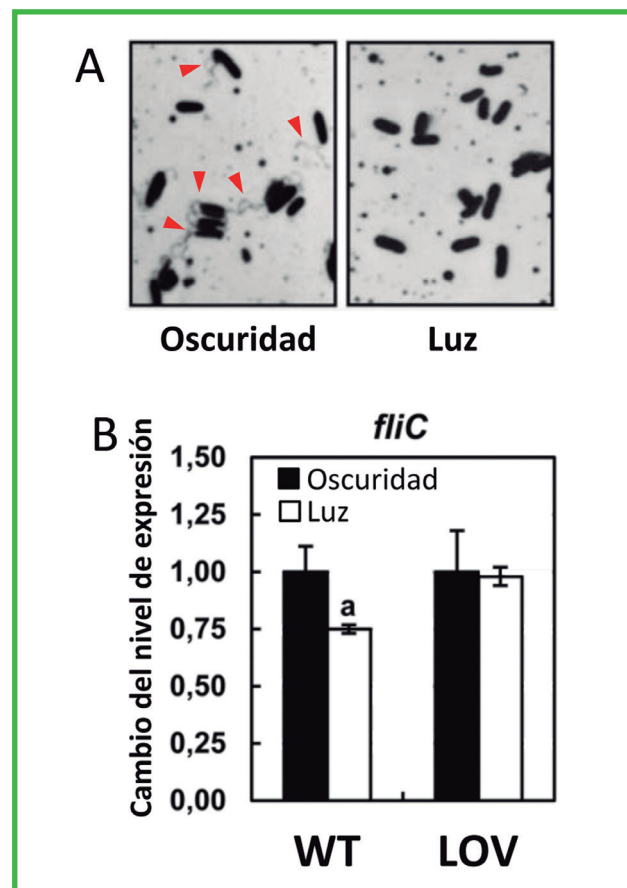
## PERCEPCIÓN DE SEÑALES AMBIENTALES: LA LUZ

Una de las señales con las que las bacterias fitopatógenas se encuentran durante la fase previa a la entrada son las condiciones lumínicas. Hoy en día es conocido cómo la luz no solo es empleada por organismos fotosintéticos sino que supone una señal que controla el estilo de vida en organismos no fototróficos (Elías-Arnanz *et al.*, 2011). Además, la luz y el ciclo circadiano regula los mecanismos de defensa de las plantas (Bhardwaj *et al.*, 2011). Los patógenos de plantas han debido evolucionar para percibir condiciones de luz asociadas con diferentes niveles de defensa en plantas. En el caso de PsPto nuestro grupo ha descrito recientemente cómo la luz blanca, y en concreto su componente azul, es responsable de la inhibición de la motilidad (Figura 1) y de la promoción de la adherencia a hojas cuando las condiciones son de alta intensidad lumínica. Estas condiciones se corresponden con estadios diurnos en los que la bacteria permanecería preferencialmente en un estadio sésil y protegida de otros factores de estrés, hasta la llegada de la noche (bajada de intensidad lumínica), momento en el que la motilidad y por tanto la entrada al interior de la planta se vería favorecida. Los mecanismos de defensa en planta son más activos durante el día, y por tanto la entrada al tejido vegetal en el periodo cercano a la noche sería más favorable para el éxito de la infección. De hecho, tratamientos de luz cortos realizados justo antes de llevar a cabo ensayos de infección en plantas, tienen un efecto significativo disminuyendo la virulencia de PsPto. Estos fenotipos se ven alterados en un mutante afectado en el fotorreceptor de luz azul LOV que ha sido identificado y caracterizado por nuestro grupo en este patógeno. Este estudio pone de manifiesto la importancia de la luz en la transición al estilo patogénico y su influencia sobre la virulencia de la bacteria (Río-Álvarez *et al.*, 2014).

Dado que no solo la intensidad de luz, sino también la calidad de la misma en cuanto a la prevalencia de distintos componentes (p.ej. azul vs rojo) es variable a lo largo del día en un lugar determinado, nos hemos propuesto llevar a cabo un estudio detallado de la influencia del ciclo de luz diario sobre el proceso de infección. Para ello, en primer lugar estamos llevando a cabo un estudio a nivel transcripcional de la regulación de distintos factores de virulencia bajo distintas condiciones de luz. Esta aproximación, nos permitirá conocer la dinámica de la infección en condiciones reales en relación a la activación de los mecanismos de virulencia dependientes de la luz en distintas fases de la infección.

## PERCEPCIÓN DE SEÑALES DE LA PLANTAS: LA QUIMIOTAXIS

La motilidad es un carácter necesario para el éxito de la infección en la mayoría de las bacterias patógenas de plantas. Determina la capacidad de entrada por heridas o entradas naturales al interior del tejido vegetal. El fenómeno de la quimiotaxis permite a las bacterias detectar gradientes de concentración de determinados compuestos y dirigir su movimiento hacia o en contra de este gradiente. Por tanto este fenómeno, en el caso de bacterias fitopatógenas podría permitir detectar potenciales sitios de entrada al interior vegetal. En el caso de Dd3937, en nuestro grupo, hemos



**Figura 1.** (A) Imágenes de microscopía óptica (630x) de bacterias de la cepa silvestre de PsPto teñidas específicamente para la visualización del flagelo sometidas a condiciones de luz u oscuridad. Las células obtenidas de las placas sometidas a iluminación prácticamente carecen de flagelos (señalados por una flecha roja en el panel de tratamiento en oscuridad). (B) La expresión del gen *fliC* de PsPto, que codifica la flagelina, la principal proteína estructural del flagelo, disminuye significativamente tras un tratamiento de 10 min con luz blanca en comparación con el tratamiento en oscuridad (analizado por qRT-PCR). Dicha expresión, sin embargo, no se ve alterada bajo el mismo tratamiento en el caso de la cepa mutante en el gen que codifica el fotorreceptor LOV de PsPto.

determinado como la motilidad es esencial para el desarrollo de la infección en plantas huéspedes y hemos descrito el patrón de quimio percepción hacia distintos compuestos derivados de plantas (Antúñez-Lamas *et al.*, 2009a). Además hemos determinado como la atracción hacia la hormona vegetal ácido jasmónico es determinante del proceso de entrada a través de heridas (Antúñez-Lamas *et al.*, 2009b).

El proceso de quimiotaxis comienza con la función de unas proteínas quimiorreceptoras conocidas como MCPs (*methyl-accepting chemotaxis proteins*) que reconocen, generalmente a nivel del periplasma, determinados compuestos. Este reconocimiento desencadena un proceso de transducción de señal que concluye en la regulación del motor flagelar, y por tanto en el control de la motilidad. El dominio de estas proteínas implicado en la percepción se denomina LBR (*Ligand Binding Region*). Recientemente y con el objetivo de identificar quimiorreceptores implicados en la percepción de compuestos derivados de heridas en la planta, hemos llevado a cabo un estudio bioinformático que nos ha permitido identificar las proteínas MCP en Dd3937 y analizar sus LBR. La construcción de mutantes en 10 MCP seleccionadas por su frecuencia de aparición en bacterias patógenas de plantas, y los ensayos de quimioatracción y entrada en plantas, nos han permitido determinar la implicación de al menos dos de estos quimiorreceptores durante el proceso de entrada. Los datos sugieren que estos candidatos podrían participar en la percepción de xilosa y ácido jasmónico respectivamente (Río-Álvarez *et al.*, 2015).

En el caso de PsPto también estamos definiendo el perfil de quimiotrayentes que pudieran ser percibidos durante el proceso de entrada. En concreto estamos trabajando en la actualidad con el comportamiento de esta cepa frente a distintas moléculas de la familia de las oxilipinas generadas en la herida.

Con el objetivo de conocer mejor el fenómeno de percepción de compuestos derivados de la planta través de las proteínas MCPs, estamos iniciando el estudio del comportamiento de mutantes en quimiorreceptores en ambas bacterias modelo frente a extractos fraccionados de plantas y frente a colecciones sintéticas de químicos diseñados en base a información sobre la composición de extractos vegetales. El conocimiento de el fenómeno de percepción, dada su relevancia durante los estadios iniciales de la infección, será de gran utilidad en el diseño de estrategias de interacción en el establecimiento de la enfermedad.

Una vez en el apoplasto, las bacterias fitopatógenas han de adaptarse entre a otros factores, a la presencia de moléculas de defensa de la planta. Hemos llevado a cabo un estudio transcriptómico en Dd3937 con el fin de comprender el proceso de adaptación en este patógeno a la presencia de péptidos antimicrobianos que son comunes en plantas. Este estudio nos ha permitido conocer cómo las bacterias reprograman la expresión génica con la finalidad de sobreexpresar, por una parte genes involucrados en respuesta a estrés general, así como mecanismos de respuesta específicos como es el caso de la remodelación de la composición de la membrana o la expresión de transportadores específicos (Río-Álvarez *et al.*, 2012).

## HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS PARA EL ESTUDIO DE LAS BACTERIAS ASOCIADAS A PLANTAS

La rápida mejora y abaratamiento de las técnicas de secuenciación ha permitido que dispongamos hoy de una gran cantidad de datos genómicos en los repositorios públicos; esto hace particularmente importante el análisis de dichos datos y el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas que lo faciliten. Recientemente hemos analizado el genoma de la cepa UMAF0158, en colaboración con investigadores de la universidad de Málaga (Martínez-García *et al.*, 2015a). Dicha cepa es responsable de la necrosis apical del mango. Este análisis ha permitido identificar algunos factores diferenciales que podrían explicar su interacción con un hospedador leñoso, tales como nuevos sistemas de secreción, un repertorio específico de efectores y un operón implicado en la producción de celulosa (Arrebola *et al.*, 2015). En colaboración con el mismo grupo hemos comparado los genomas de dos importantes cepas *Bacillus amiloliquefaciens* utilizadas en control biológico (Magno-Pérez-Bryan *et al.*, 2015). Así mismo, hemos secuenciado y analizado el genoma de la cepa endófito de olivo *Pseudomonas fluorescens* PICF7, en colaboración con un grupo del IAS de Córdoba; dicha cepa es un efectivo agente de biocontrol contra la verticilosis del olivo y su análisis reveló genes potencialmente implicados en su interacción con la planta, tales como sistemas de secreción de los tipos 3 y 6, sideróforos, enzimas detoxificadoras y compuestos volátiles (Martínez-García *et al.*, 2015b).

En paralelo hemos desarrollado dos herramientas bioinformáticas para el análisis de genomas bacterianos en el contexto de las interacciones planta-bacteria. T346Hunter (Martínez-García *et al.*, 2015c) es una aplicación web que permite identificar genes implicados en la síntesis de los componentes estructurales de los sistemas de secreción de tipo 3,4 y 6, los cuales tienen una probada implicación en la interacción planta-bacteria. Una segunda aplicación web denominada PIFAR (*Plant-bacteria Interaction Factors Resource*) consiste en un repositorio público de determinantes genéticos bacterianos implicados en la interacción planta-bacteria. Este trabajo parte de una búsqueda bibliográfica extensiva a partir de la cual se desarrolló una base de datos de factores genéticos. El usuario puede identificar en sus propios datos genómicos la presencia de factores similares (a través de un interfaz on-line). La herramienta se ejecutó sobre 3042 genomas bacterianos y los resultados también son accesibles a través de la interfaz (Martínez-García *et al.*, en revisión).

Por último, hemos abordado el problema de la clasificación de genomas bacterianos en relación a su interacción con plantas. Para ello se combinaron las herramientas anteriormente descritas (T346Hunter y PIFAR) y se empleó un clasificador de aprendizaje automático (Random Forest) para generar un modelo probabilístico basado en las anotaciones de ambas herramientas sobre una selección de 420 genomas bacterianos. La aplicación de este clasificador sobre 9500 genomas bacterianos ha revelado potenciales

asociaciones con plantas de una serie de cepas bacterianas comúnmente conocidas por producir enfermedades en mamíferos (Martínez-García *et al.*, en revisión).

## REFERENCIAS

- Antúñez-Lamas M, Cabrera-Ordoñez E, López-Solanilla E, Raposo R, Trelles-Salazar O, Rodríguez-Moreno A, Rodríguez-Palenzuela P. (2009a). Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937) (2009a) Role of motility and chemotaxis in the pathogenesis of *Dickeya dadantii* 3937 (ex *Erwinia chrysanthemi* 3937). *Microbiology* 155: 434-42.
- Antúñez-Lamas, M, Cabrera E, López-Solanilla E, Solano R, González-Melendi P, Chico J.M, Toth, I, Birch P, Pritchard L, Liu H, Rodríguez-Palenzuela, P. (2009b). Bacterial chemoattraction towards jasmonate plays a role in the entry of *Dickeya dadantii* through wounded tissues. *Mol Microbiol* 74:662-71.
- Arrebola E, Carrión VJ, Gutiérrez-Barranquero JA, Pérez-García A, Rodríguez-Palenzuela P, Cazorla FM, de Vicente A. (2015). Cellulose production in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: a compromise between epiphytic and pathogenic lifestyles. *FEMS Microbiol Ecol*. 91.
- Bhardwaj V, Meier S, Petersen LN, Ingle RA y Roden LC. (2011). Defence responses of *Arabidopsis thaliana* to infection by *Pseudomonas syringae* are regulated by the circadian clock. *PLoS ONE* 6: e26968.
- Elías-Arnanz M, Padmanabhan S y Murillo FJ (2011). Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Curr Opin Microbiol* 14: 128-35.
- Magno-Pérez-Bryan MC, Martínez-García PM, Hierrezuelo J, Rodríguez-Palenzuela P, Arrebola E, Ramos C, de Vicente A, Pérez-García A, Romero D. (2015). Comparative Genomics Within the *Bacillus* Genus Reveal the Singularities of Two Robust *Bacillus amyloliquefaciens* Biocontrol Strains. *Mol Plant Microbe Interact* 28:1102-16.
- Martínez-García PM, Rodríguez-Palenzuela P, Arrebola E, Carrión VJ, Gutiérrez-Barranquero JA, Pérez-García A, Ramos C, Cazorla FM, de Vicente A. (2015a). Bioinformatics analysis of the complete genome sequence of the mango tree pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* UMAF0158 reveals traits relevant to virulence and epiphytic lifestyle. *PLoS ONE* 10:e0136101. doi:10.1371/journal.pone.0136101.
- Martínez-García PM, Ruano-Rosa D, Schilirò E, Prieto P, Ramos C, Rodríguez-Palenzuela P, Mercado-Blanco J. (2015b). Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahliae*. *Stand Genomic Sci* 10:10. doi: 10.1186/1944-3277-10-10.
- Martínez-García PM, Ramos C, Rodríguez-Palenzuela P (2015c). T346Hunter: a novel web-based tool for the prediction of type III, type IV and type VI secretion systems in bacterial genomes. *PLoS ONE*. 10:e0119317. doi: 10.1371/journal.pone.0119317.
- Río-Alvarez I, Rodríguez-Herva JJ, Cuartas-Lanza R, Toth I, Pritchard L, Rodríguez-Palenzuela P, López-Solanilla E. (2012). Genome-wide analysis of the response of *Dickeya dadantii* 3937 to plant antimicrobial peptides. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 523-33.
- Río-Álvarez I, Rodríguez-Herva JJ, Martínez PM, González-Melendi P, García-Casado G, Rodríguez-Palenzuela P, López-Solanilla E. (2014). Light regulates motility, attachment and virulence in the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Environ Microbiol* 16: 2072-85.
- Río-Álvarez, I, Rodríguez-Herva JJ, Martínez PM, González-Melendi P, García-Casado G, Rodríguez-Palenzuela P, López-Solanilla E. (2015). Role of *Dickeya dadantii* 3937 chemoreceptors in the entry to *Arabidopsis* leaves through wounds. *Molecular Plant Pathol* 16: 685-98.

