

## La simbiosis entre *Lotus japonicus* y rizobio: Función de la variación estructural del factor nod.<sup>1</sup>

[CRISTINA PACIOS-BRAS\\*](#)

Laboratoire des Proteines du Cytosquelette, Leiden University, 41, Rue Jules Horowitz, F-38027 Grenobl, Cedex, France

\*Corresponding author

<sup>1</sup> Tesis de Doctorado. Título original: The symbiosis between *Lotus japonicus* and rizobia: Function of nod factor structural variation, 132 p.

### Capítulo 7. Resumen y discusión

Las legumbres, junto con los cereales, representan una de las fuentes de mayor importancia en la alimentación tanto humana como del ganado. Adicionalmente, las legumbres tienen la habilidad de enriquecer la tierra mediante fijación de nitrógeno atmosférico en formas asimilables. El nitrógeno fijado por las legumbres puede ser utilizado por otras plantas de interés incapaces de fijar nitrógeno. Los romanos fueron los primeros en aplicar el sistema de rotación de tierras o barbecho con la finalidad de enriquecer la tierra con nitrógeno y, de esta forma, mejorar el crecimiento de otras plantas de interés agrícola (como cereales) sin la capacidad de fijación de nitrógeno de las legumbres. El sistema se sigue utilizando en nuestros días y representa una importante alternativa al uso de abonos artificiales. En 1888 Hellriegel asignó por primera vez la propiedad la capacidad de fijar nitrógeno de las legumbres a la existencia de bacterias (bacterias pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* o rizobios) dentro de pequeños órganos (nódulos) presentes en las raíces de estas plantas. La interacción rizobio-leguminosa es una relación de simbiosis, en la que tanto planta como bacteria son beneficiados. En el mismo año Bréal demostró que no todas las leguminosas tienen la capacidad de formar nódulos con todas las especies de *Rhizobium*, definiendo así la especificidad en nodulación. Lerouge describió por primera vez la estructura de las moléculas bacterianas (factores de nodulación o factores Nod) encargadas de inducir la formación de los nódulos y de decidir la especificidad leguminosa-bacteria. La mayoría de los factores Nod presentan una estructura común. Dicha estructura está formada por un esqueleto central de quitina (de cuatro a seis unidades de N-acetylglucosamina unidas entre sí por enlaces  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4) con un ácido graso metilado en el extremo reductor de la cadena. Además, la cadena puede estar metilada, fucosilada, acetilada o sulfatada tanto en el extremo reductor como en el no reductor. Actualmente, las estructuras de la mayoría de los factores Nod producidos por la mayor parte de los rizobios son conocidas y el grueso de la investigación se centra en el análisis del sistema específico de percepción de estos factores por parte de la planta. En el capítulo 1 de esta tesis resumimos el conocimiento recopilado hasta este momento sobre la estructura y la función de los factores Nod. No obstante, con el trabajo descrito en esta tesis mostramos que todavía existen preguntas sin respuesta acerca de las moléculas señal producidas por las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*.

Para la mayoría de nuestros experimentos de nodulación hemos empleado la leguminosa

modelo *Lotus japonicus* y su bacteria simbiótica *Mesorhizobium loti*. *L. japonicus* pertenece al grupo de leguminosas con nódulos de crecimiento determinado. En este tipo de leguminosas las primeras divisiones celulares que preceden la formación del nódulo se producen en el cortex externo. Estos nódulos presentan un meristemo persistente dando lugar a estructuras de forma esférica. A lo largo de esta tesis corroboramos que *L. japonicus* es un sistema muy adecuado para el estudio de la nodulación determinada. Durante nuestro trabajo hemos analizado la relación existente entre la estructura y la función de los factores Nod reconocidos por *L. japonicus*, para ello hemos desarrollado nuevas técnicas que facilitan nuestro estudio.

Para un mejor estudio de las respuestas de la planta a los factores Nod hemos transformado *L. japonicus* con marcadores enzimáticos o fluorescentes [ $\beta$  glucuronidasa (GUS) o “green fluorescent protein” (GFP)] unidos a promotores vegetales sometidos a regulación durante la interacción simbiótica con *Rhizobium*. Un ejemplo de un promotor regulado durante el proceso de nodulación utilizado en este trabajo, es el promotor dependiente de la concentración de auxina GH3.

Para facilitar la detección de las poblaciones bacterianas durante la invasión de la raíz, que se produce por medio de la formación de estructuras llamadas cordones de infección, desarrollamos un método nuevo con el que podemos visualizar simultáneamente una o más poblaciones bacterianas diferentes como entidades fluorescentes durante la colonización de la raíz.

Para el estudio de genes de nodulación (o genes nod) aislados del cromosoma bacteriano durante la simbiosis con *L. japonicus*, hemos expresado los genes *nodZ* y *nolL* de *M. loti* en *Rhizobium leguminosarum*, que no tiene estos genes nod y tampoco es capaz de inducir nodulación en *L. japonicus*. La expresión heteróloga de estos genes por parte de *R. leguminosarum* confiere a esta especie la capacidad de nodular *L. japonicus*. Este sistema de expresión heteróloga permite el estudio de genes nod de forma aislada, sin la influencia del fondo genético de la cepa bacteriana silvestre, *M. loti*. Para esta tesis, nos hemos centrado en el estudio de la función del gen de nodulación *nolL* a lo largo de la interacción bacteria-leguminosa tanto por medio de la aplicación del sistema de expresión heteróloga como por mutación de este gen en *M. loti*.

También hemos aislado y caracterizado las estructuras de los factores Nod sintetizados por una cepa de *Rhizobium etli*, KIM5s, que al contrario que otras cepas de la misma especie, es incapaz de nodular *L. japonicus*. Esta cepa resultó sintetizar factores Nod totalmente distintos a los anteriormente descritos. También demostramos que la mutación en esta cepa de un gen con alta homología con *nodZ*, conlleva la modificación de la estructura de los factores Nod producidos y permite la nodulación en *L. japonicus*.

## **Visualización de rizobios durante la interacción simbiótica con legumbres (Capítulo 2)**

En el capítulo 2 describimos un sistema desarrollado para facilitar la visualización *in vivo* de

los rizobios durante su interacción simbiótica con las leguminosas. A este efecto, hemos construido vectores estables que codifican la proteína GFP o sus formas derivadas [ECFP (“cyan fluorescent protein”) o EYFP (“yellow fluorescent protein”)]. Estos vectores se expresan eficientemente en distintas especies bacterianas y han demostrado ser muy adecuados para el análisis de bacterias durante el proceso de infección. Dos poblaciones bacterianas, cada una marcada con una proteína fluorescente diferente (ECFP o EYFP) fueron coinoculadas en la raíz de una misma leguminosa y a continuación fueron visualizadas con la ayuda de la microscopía de fluorescencia confocal (CLSM). Mediante aplicación de este sistema hemos demostrado que dos poblaciones bacterianas marcadas diferentemente pueden formar parte del mismo cordón de infección y, en estadíos más tardíos de la simbiosis, ambas poblaciones se pueden localizar en el mismo nódulo. También hemos descrito la existencia de movimientos de bacteroides, que son la forma fijadora de las bacterias dentro del nódulo.

### **Distribución de auxina en *L. japonicus* durante el desarrollo de la nodulación (Capítulo 3)**

Uno de los primeros cambios perceptibles en las legumbres durante el comienzo y el desarrollo de la nodulación en respuesta a la infección rizobiana son los cambios en la distribución de auxina en la raíz de la leguminosa. Con el propósito de analizar la distribución de auxina durante el desarrollo de los nódulos en una leguminosa con nódulos de crecimiento determinado hemos utilizado como modelo *L. japonicus*. Con esta finalidad hemos construido líneas transgénicas de *L. japonicus* que expresan el promotor GH3, que es sensible a los cambios de concentración de auxina, fusionado a los genes marcadores GFP y GUS. El promotor GH3 se expresa con mayor intensidad en partes de la planta en las que la concentración de auxina es más alta.

La expresión de GH3 fue detectada como una señal fluorescente cuando se utilizó GFP o como una coloración azul cuando se analizó la actividad de GUS. El patrón de expresión GH3/GUS durante la nodulación de la leguminosa *Trifolium repens* (trébol blanco) ha sido descrita con anterioridad. Esta leguminosa tiene nódulos de crecimiento indeterminado los cuales se caracterizan por presentar las primeras divisiones celulares en la endodermis de la raíz y presentan un meristemo persistente. Como resultado estos nódulos tienen forma alargada. En este trabajo demostramos la existencia de diferencias en la distribución de auxina a lo largo del desarrollo de la respuesta simbiótica entre leguminosas con nódulos de crecimiento determinado y leguminosas con nódulos de crecimiento indeterminado. En *L. japonicus*, la expresión de GUS y de GFP es más alta en las zonas donde las divisiones celulares tienen lugar como inicio de la formación del nódulo. Esta señal era claramente discernible de la expresión del tejido vascular de la raíz principal. En los primordios nodulares y nódulos jóvenes, este aumento de la expresión del promotor GH3 se mantiene, siendo patente en el cortex. En nódulos maduros la expresión cortical desaparece y sólo es detectable en el tejido vascular del nódulo. También hemos cuantificado las diferencias en la expresión del promotor GH3 “*in vivo*” utilizando la expresión de GFP en primordios nodulares y en nódulos maduros.

## **Función de la proteína de nodulación Noll durante la simbiosis con *L. japonicus* (Capítulos 4 y 5)**

*R. leguminosarum* RBL5560 tiene la capacidad de nodular *Vicia* pero es incapaz, en condiciones normales, de nodular *L. japonicus*. La introducción de FITAnodD (activador de la transcripción independiente de la activación por flavonoides) y el gen de la fucosil transferasa *NodZ* da lugar a una nueva cepa (5560DZ) capaz de producir factores Nod fucosilados y de nodular *L. japonicus*. Cuando a 5560DZ se le introduce también el gen *noll* de *M. loti*, para dar 5560DZL, el número y la morfología de los nódulos producidos por *L. japonicus* tiene niveles comparables a los inducidos por la cepa silvestre, *M. loti*. El aislamiento y análisis de la estructura de los factores Nod producidos por 5560DZL indica que, la proteína codificada por el gen *noll* de *M. loti* (*Noll*) es una acetil transferasa encargada de transferir un grupo acetilo a la fucosa del extremo reductor de los factores Nod. Los estudios de microscopía realizados a lo largo del desarrollo de la nodulación inducida tanto por 5560DZ como por 5560DZL, ambas cepas expresando adicionalmente el marcador  $\beta$ -galactosidasa, indican que la presencia de *Noll* es indispensable para el correcto desarrollo del cordón de infección en *L. japonicus*.

Microscopía electrónica demuestra que en estadios posteriores la presencia de *Noll* es necesaria para la correcta organización del nódulo. El seguimiento del proceso de colonización por parte de 5560DZ y 5560DZL realizado con CLSM después de aplicar el método descrito en el capítulo 2, indica que cuando las dos cepas son coinoculadas sobre las raíces de *L. japonicus*, 5560DZL es siempre más eficiente durante la invasión de la raíz y la colonización del nódulo. La inoculación de ambas cepas en líneas transgénicas de *Lotus japonicus* expresando el promotor ENOD40 o el promotor GH3 (capítulo 3) muestra que la ausencia de *Noll* en 5560DZ retarda claramente la inducción de estos promotores y que, una vez inducidos, raramente alcanzan el patrón de expresión inducido por el simbionte silvestre, *M. loti*. Al contrario, la inoculación de 5560DZL induce estos mismos promotores en tiempos y niveles similares a los inducidos por la cepa silvestre.

La inoculación de 5560DZ o 5560DZL en otras especies del género *Lotus* dio lugar a resultados divergentes. *Lotus filicaulis* no nodula después de la inoculación con estas cepas, indicando una percepción diferente de los factores Nod por esta leguminosa. Esto demuestra una vez más la especificidad en el reconocimiento de los factores Nod producidos por la bacteria por parte de la leguminosa.

La inoculación de *L. japonicus* con un mutante de *M. loti* (R7A::*noll*) demuestra que cuando el fondo genético es el de la bacteria silvestre, la nodulación en *L. japonicus* es suprimida. La inoculación de una cepa mutante de *M. loti* (PN184) induce hipernodulación en *L. japonicus* y *Lotus filicaulis*. Cuando *noll* está inactivado en PN184, la nodulación revierte a la cantidad normal de nódulos en las dos leguminosas. La combinación de nuestros resultados demuestra que en todos los casos la pérdida de la función de *Noll* (cuando no está presente en 5560DZ, cuando es mutado en *M. loti* o cuando es mutado en PN184) siempre se traduce en un efecto negativo en la cantidad de nódulos producidos. Sin embargo, la medida de este efecto depende totalmente de la cepa bacteriana. La ausencia de *Noll* en PN184 y

5560DZ no suprime la nodulación en *L. japonicus* pero cuando *nolL* es mutado en la cepa silvestre, *M. loti*, no se producen nódulos. En base a los resultados obtenidos proponemos que *NolL* puede tener una función adicional a la fucosilación de los factores Nod. Esta función adicional puede ser reemplazada por otros genes en nuestro sistema de expresión heteróloga y también en PN184 de forma que la nodulación de *L. japonicus* es viable.

El reconocimiento diferencial de 5560DZ y 5560DZL por *L. japonicus* y *L. filicaulis* sugiere especificidad para otros factores bacterianos distintos a los factores Nod. Esta especificidad adicional puede deberse a otros factores como son los exopolisacaridos y los lipopolisacaridos bacterianos.

## **Estructuras de los factores Nod producidos por *R. etli* KIM5s y por su mutante KIM::*nodZ* y su relación con su capacidad simbiótica (Capítulo 6)**

Normalmente, *R. etli* produce factores Nod con estructuras pentaméricas y tiene como sustituyente una fucosa acetilada en el extremo reductor del esqueleto de quitina. Esta estructura es idéntica a la sintetizada por *M. loti*.

*R. etli* KIM5s es una de las cepas de *R. etli* que mejor nodula *Phaseolus vulgaris* (judía), debido a su alta competitividad y a su alta tasa de fijación de nitrógeno. Nosotros demostramos que KIM5s tiene un rango de nodulación restringida siendo, al contrario que otras cepas de la misma especie, incapaz de nodular *L. japonicus*. La mutación en KIM5s de un gen con alta homología con *nodZ* da lugar a una cepa (KIM::*nodZ*), que al igual que *R. etli* CE3<sup>63</sup> es capaz de nodular *L. japonicus*.

Los factores Nod de KIM5s y su cepa mutante, KIM::*nodZ* fueron aislados y analizados mediante un sistema de espectrometría de masas directamente conectado a una columna de fase reversa.

Los resultados obtenidos indican que *R. etli* KIM5s sintetiza principalmente factores Nod hexaméricos, una estructura raramente encontrada en la familia *Rhizobiaceae* y nunca encontrada con anterioridad en otra cepa de esta especie. Sorprendentemente, estos factores Nod a menudo contienen una o dos glucosaminas no acetiladas. Esta clase de moléculas nunca han sido aisladas con anterioridad en ningún rizobio.

El análisis de los factores Nod sintetizados por Kim5s y KIM::*nodZ* muestra la ausencia de factores Nod hexaméricos y la presencia de estructuras mayoritariamente pentaméricas. Previamente se ha demostrado la existencia de una relación entre la longitud del esqueleto de quitina y sus substituyentes en relación con su especificidad durante la inducción de la respuesta simbiótica en raíces de *Glycine max* (Soja). La variación en la respuesta de la legumbre inducida por estructuras distintas de factores Nod se cree que es debida a un reconocimiento diferencial de estas moléculas por las quitinasas de la legumbre. Este podría ser también el caso durante el reconocimiento de KIM5S y KIM::*nodZ* por *L. japonicus*. Nosotros proponemos que las diferencias en estructura de los factores Nod producidos por

*R. etli* KIM5s y su cepa mutante KIM::*nodZ* pueden inducir un reconocimiento diferente por parte de las quitinasas de *L. japonicus*, conduciendo a la ausencia de nodulación en el caso de KIM5S y a la nodulación de KIM::*nodZ*.

## **Perspectivas futuras**

El propósito de este estudio fue examinar el comportamiento simbiótico de *L. japonicus* y la importancia de las modificaciones estructurales del factor Nod durante la simbiosis con esta leguminosa. Nuestros resultados muestran que aunque hay un conocimiento amplio sobre la estructura y biosíntesis de los factores Nod, todavía permanece sin contestar muchas preguntas sobre la señalización bacteriana respecto a la percepción de la planta durante la simbiosis.

Más experimentación en leguminosas transformadas con genes relacionados a las respuestas de la planta durante la nodulación, ligado a los genes reporteros, nos ayudará a ver la simbiosis de rizobio-leguminosa como un solo sistema interactivo. Por ejemplo, las líneas transformadas de *L. japonicus* usadas para algunos experimentos en esta tesis: ENOD40*gusA:intron/gfp* y GH3 *gusA:intron/gfp*. Estas herramientas nos proporcionarán más conocimiento sobre las exactas estructuras bacterianas requeridas para la respuesta simbiótica de la planta. Para estos estudios, las herramientas del microscopio como CLSM y microscopía de dos-fotón junto con la disponibilidad de sistemas de la leguminosa modelo, jugará un papel importante. Los adelantos rápidos en proteómica están trayendo más conocimientos de las respuestas simbióticas de la planta en el tiempo.

El fin último, un mejor conocimiento de la simbiosis, nos ayudará definitivamente a mejorar la calidad de los cultivos para el ganado y la alimentación humana en la agricultura sustentable. Por ejemplo, nuestro conocimiento puede usarse para la selección de cepas naturales más óptimas en la competitividad durante la infección de algunas leguminosas, como en el caso del sistema de los heterólogos descrito durante esta tesis. Esto podría aplicarse para favorecer el desarrollo de simbiosis entre el rizobio seleccionado y la leguminosa de interés. De esta manera pueden disminuirse los rizobios endógenos que a menudo muestran pobre capacidad de fijación de nitrógeno.