

# Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol

Carmen Quinto y Luis Cárdenas

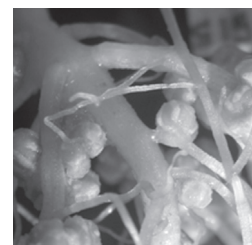
El nitrógeno es un elemento fundamental para el desarrollo de los seres vivos ya que forma parte de moléculas esenciales como los ácidos nucleicos, los aminoácidos y las vitaminas, entre otros. A pesar de que la atmósfera tiene un alto contenido de nitrógeno (78%), son pocos los organismos capaces de utilizarlo directamente en sus procesos vitales. El humano, al igual que los animales superiores, no puede utilizar el nitrógeno de la atmósfera, por lo que tiene que obtenerlo a partir de los alimentos que consume.

Sin embargo, existen microorganismos que sí son capaces de utilizar el nitrógeno atmosférico y transformarlo en compuestos fácilmente asimilables. Tal es el caso de bacterias del suelo de la familia *Rhizobiaceae*. Estas bacterias poseen un complejo multienzimático conocido como *nitrogenasa* que convierte el nitrógeno diatómico ( $N_2$ ) en su forma reducida, el ión amonio ( $NH_4^+$ ), el cual es un compuesto nitrogenado asimilable.

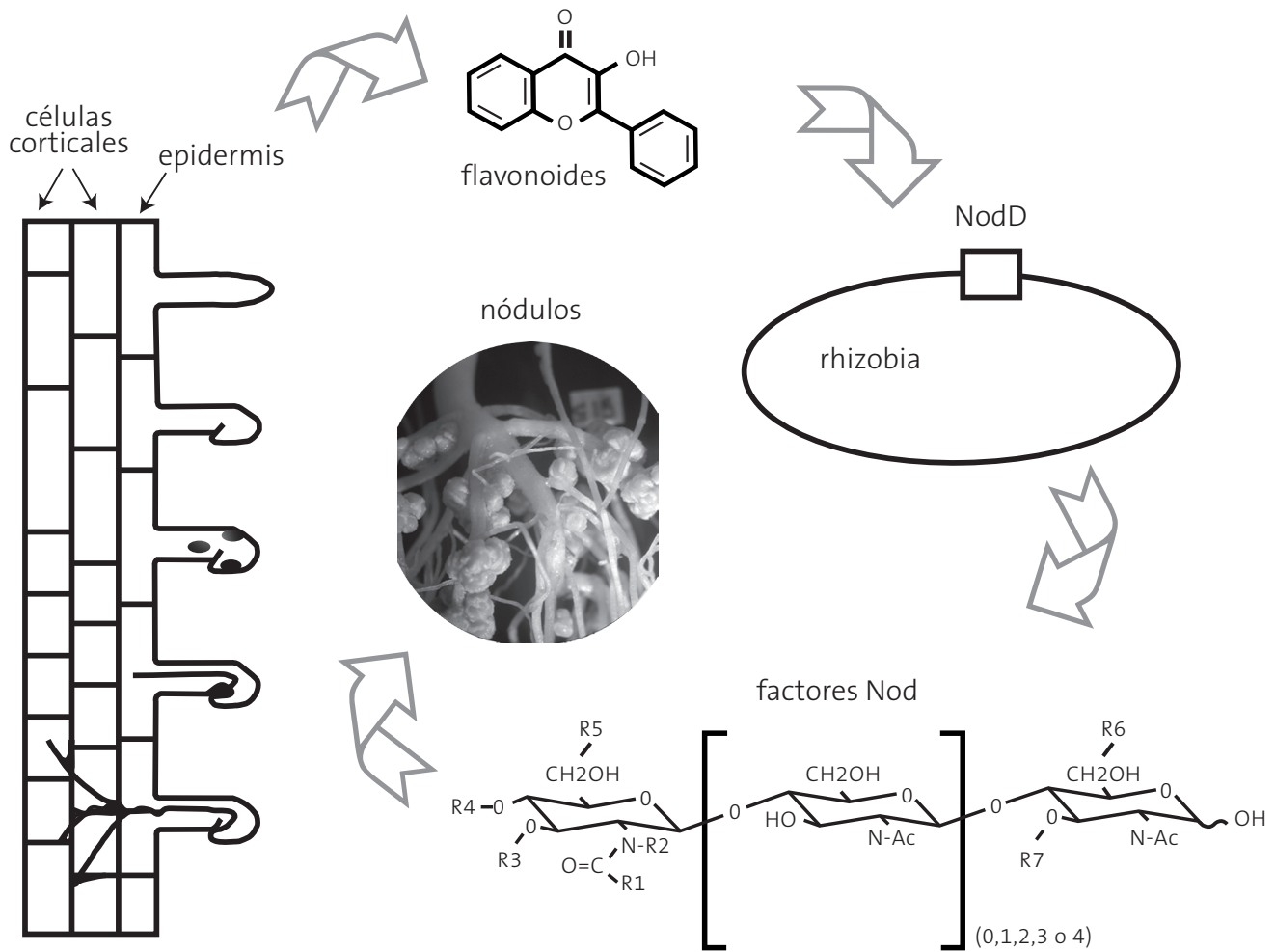
Las rhizobiaceas, conocidas genéricamente como "rizobios", constituyen un grupo heterogéneo de microorganismos distribuidos en diversos géneros: *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, que forman asociaciones sim-

bióticas con raíces de plantas leguminosas de gran importancia económica, como por ejemplo el frijol, la alfalfa y el cacahuate. Durante la simbiosis estas bacterias inducen la formación de un nuevo órgano en la raíz de la leguminosa, llamado *nódulo*, en el cual viven las bacterias y llevan a cabo el proceso de fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Gracias a este proceso, la planta utiliza el amonio sintetizado por los rizobios y así se provee de las fuentes de nitrógeno que requiere para vivir. Los rizobios, a su vez, reciben esqueletos de carbono de la planta para sus funciones vitales. Este proceso de fijación biológica de nitrógeno que ocurre en el suelo hace prescindible el uso de abonos o fertilizantes nitrogenados para las plantas que establecen simbiosis con los rizobios, evitándose así problemas de contaminación ambiental e inversión económica cuantiosa.

En este capítulo revisaremos las etapas iniciales del proceso simbiótico que se establece entre las raíces de las leguminosas y los rizobios del suelo. Comenzaremos analizando un diálogo molecular que se establece entre ambos participantes en este proceso, a los que llamaremos *simbiontes* (individuos asociados en simbiosis), diálogo que es esencial para que la interacción simbiótica se lleve a cabo.



273



**Figura 1.** El diagrama muestra de manera general el intercambio de señales que se establece entre la planta y la bacteria. La planta secreta los flavonoides específicos. La bacteria reconoce los flavonoides y produce los factores nod específicos. Estos factores nod le permiten al rizobio penetrar en la planta e inducir la formación de nódulos radicales.

### El encuentro requiere de un diálogo molecular

La comunicación entre los simbioses comienza con la liberación a la rizósfera (parte del suelo inmediata a la raíz), por parte de la leguminosa, de metabolitos secundarios contenidos en sus exudados de semilla y de raíz, principalmente compuestos de naturaleza flavonoide como naringenina, genisteína y daidzeína, así como ácidos aldónicos y betaínas, que hacen que específicamente los rizobios sean atraídos químicamente hacia la región apical (punta) de los pelos radicales. Estas moléculas varían en cantidad y composición, dependiendo de la especie vegetal de que se trate. Así, estos compuestos son la primera molécula señal emitida dentro del diálogo molecular que se establece entre la planta y la bacteria (figura 1). Si los compuestos flavonoides secretados por la planta son reconocidos por los rizobios, en estos últimos se inicia la transcripción (proceso mediante el cual un gene o genes codificados en el ADN se copian a ARN mensajero) de los genes denominados de nodulación (genes *nod*). El proceso de transcripción de los genes *nod* de la bacteria involucra a una proteína de origen bacteriano llamada NodD, la cual al entrar en contacto con los flavonoides modifica su conformación y permite que la enzima encargada (ARN polimerasa, que lleva a cabo la transcripción de los genes *nod*) realice su función. Entonces, la traducción (proceso mediante el cual los ARN mensajeros son “traducidos” a proteínas) de los genes *nod*, da como resultado la producción de un conjunto de enzimas encargadas de la síntesis y secreción de los denominados factores de nodulación (factores Nod). La mayoría de los factores Nod descritos hasta la fecha consisten en un esqueleto básico de 3, 4 o 5 residuos de N-acetil-D-glucosamina, unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, modificados (“decorados”) químicamente, dependiendo de cada especie de rizobio. No todos los rizobios forman los mismos factores Nod. Las “decoraciones” químicas de los factores Nod incluyen la adición de grupos metilo, acetilo, sulfato, ciertos ácidos grasos y también azúcares modificados. Estas “decoraciones”

hacen que la estructura de los factores Nod sea específica para cada especie de rizobio, lo cual hace posible a su vez, que se pueda o no establecer la simbiosis con una especie determinada de leguminosa. Este hecho nos habla del alto grado de especificidad en esta relación simbiótica. Los factores Nod juegan un papel esencial dentro del establecimiento de la simbiosis y mimetizan muchas de las respuestas que se inducen en los pelos radicales en presencia de los rizobios.

### Los factores Nod facilitan la entrada del rizobio

Los factores Nod específicos secretados a la rizósfera por el rizobio, al ser reconocidos por la planta huésped, inducen a concentraciones muy bajas (pico y nanomolares) una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en los pelos radicales de la planta. Los pelos radicales son células tubulares que se desarrollan a partir de las células más externas de la raíz (tricomas) que le permiten a la planta aumentar su superficie de absorción para adquirir nutrientes del suelo. Dentro de las respuestas inducidas por los factores Nod específicos en los pelos radicales, se encuentran cambios en los niveles del influjo y eflujo de ciertos iones como calcio, cloro, potasio y protones, a través de la membrana del pelo radical. También se han reportado cambios en el pH intracelular, el cual se hace más alcalino, en respuesta a los factores Nod. Estas modificaciones en los niveles iónicos de la célula son los responsables de inducir la despolarización de la membrana de los pelos radicales (Cárdenas *et al.*, 2000). Estudios más finos han permitido demostrar que estos cambios en la polaridad de la membrana pudieran ser los responsables de activar canales de calcio, los cuales podrían a su vez estar participando en el incremento en el influjo de este ión, observado en respuesta a los factores Nod.

Dado que el calcio es un segundo mensajero por excelencia tanto en células animales como vegetales, su estudio ha despertado un especial interés. Actualmente se sabe que además del aumento en el nivel citoplásmico de

calcio en respuesta a los factores Nod, también se observan cambios en la concentración de este ión en la región perinuclear. Esta respuesta se da aproximadamente diez minutos después del aumento en el influjo de calcio y son cambios oscilatorios, es decir, hay aumentos y decrementos en las concentraciones de este ion; a estas variaciones se les ha llamado “oscilaciones de calcio”. La magnitud y frecuencia de las oscilaciones de calcio son importantes, ya que se han observado en otros modelos de estudio y son claves para disparar cascadas de señalización, que en este caso específico, estaría ocurriendo en respuesta a los factores Nod. Además de las respuestas descritas previamente, se ha reportado que existe una participación activa del citoesqueleto en los pelos radicales de las plantas, ya que existen rearrreglos de los microfilamentos de actina y de los microtúbulos en respuesta a los factores Nod. También se ha observado que hay un incremento en la expresión de un gran número de genes de la planta, entre los que se incluyen aquellos que codifican proteínas llamadas nodulinas, las cuales están involucradas en el desarrollo y funcionamiento del nódulo. Hay nodulinas tempranas y tardías, de acuerdo a su expresión espacio-temporal durante el proceso de nodulación. Las nodulinas tempranas son aquellas que se expresan en las primeras etapas de la interacción simbiótica, antes de la fijación de nitrógeno; y las tardías, como su nombre lo indica, son aquellas transcritas en etapas más tardías, una vez que se ha iniciado la fijación de nitrógeno. Los genes que codifican las nodulinas tempranas participan en la organogénesis del nódulo, iniciando con la formación de primordios. El primordio es el resultado de la división continua de las células del córtex, las cuales entran en un proceso de varias divisiones, dando lugar a la formación de un grupo de células a las cuales se les ha llamado primordio de nódulo.

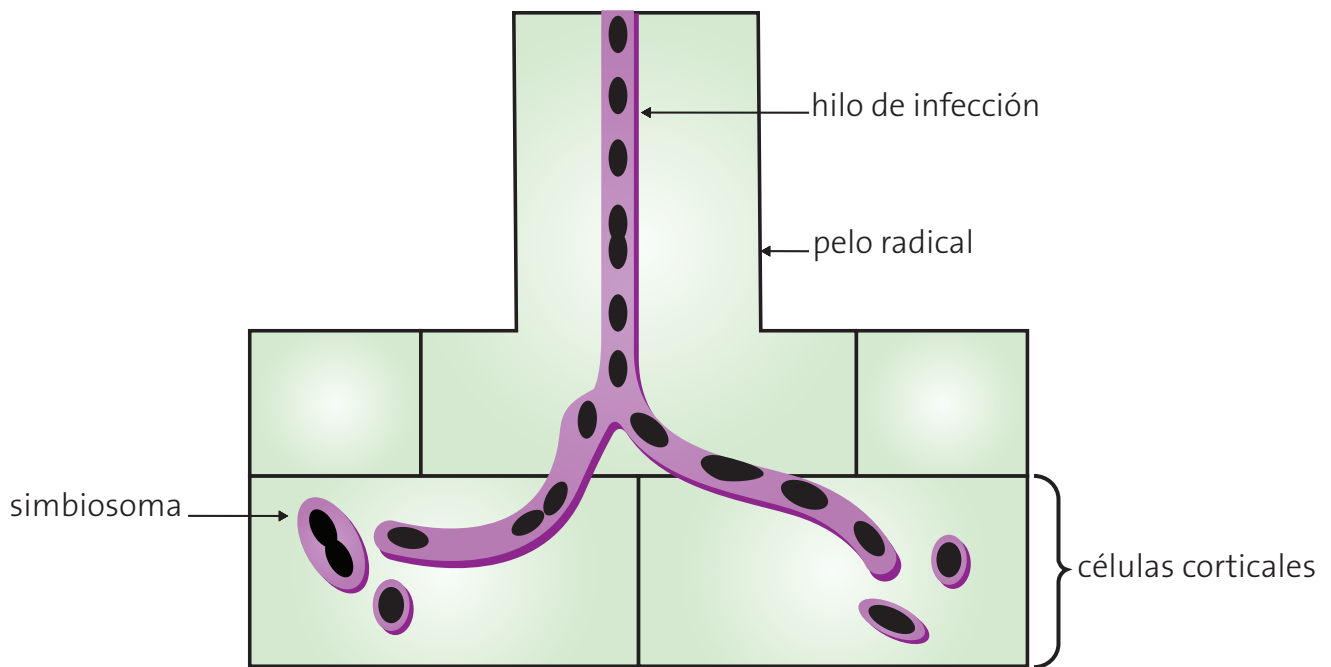
Todas las respuestas hasta aquí mencionadas y estudiadas, se inducen en ausencia del rizobio, ya que los pelos radicales se tratan únicamente con los factores Nod. Ha sido posible realizar estos estudios con la previa purifica-

ción de estos factores Nod, a partir del medio de cultivo de la bacteria (recordar que éstos se excretan) y llevando a cabo ensayos *in vitro*.

### Penetración del rizobio a la raíz y formación del hilo de infección

Para que la bacteria se adentre en el pelo radical y llegue al córtex de la raíz se requiere de la formación de una nueva estructura conocida como *hilo de infección*, el cual se forma mediante el estímulo continuo del rizobio y los factores Nod que se producen (figura 2). El hilo de infección es una estructura tubular que se forma con material de la pared del pelo radical, previniendo de esta manera el contacto directo entre el citoplasma de la célula vegetal y el rizobio, y en consecuencia, la respuesta de defensa de la planta. Los pelos radicales son células con crecimiento polarizado, lo que significa que solamente crecen en su parte apical. Este crecimiento polar es similar al que experimentan las hifas de los hongos, los tubos polínicos de las plantas y los conos neurales de los animales e involucra procesos fisiológicos básicos como son: exocitosis localizada, endocitosis, transporte de vesículas, activación de canales iónicos, una organización particular del citoesqueleto, la presencia de un gradiente apical de calcio, etc. Todos estos eventos están íntimamente relacionados entre sí, por ejemplo, los microfilamentos tienen también un papel muy importante en la organización del flujo citoplásmico transportando las vesículas hacia el polo en donde se encuentra creciendo el pelo radical. Otro elemento crucial en los eventos de exocitosis localizada es el calcio, ya que el proceso de exocitosis está relacionado con un aumento en los niveles intracelulares de calcio.

La formación del hilo de infección que se inicia en el ápice del pelo radical, en respuesta al rizobio, es un reto para la célula, ya que ésta deja de crecer de forma polar. El primer efecto morfológico producido por los factores Nod, previo a la formación del hilo de infección, es un hinchamiento en la zona apical del pelo que eventualmente da lugar a un enroscamiento



**Figura 2.**

Los rizobios penetran en los pelos radicales a través de un hilo de infección. El estímulo directo de los rizobios en la región apical de los pelos radicales y la secreción continua de los factores Nod permite la formación de un túnel a través del cual la bacteria penetra en la planta y llega a las células del córtex en donde finalmente se forman los simbiosomas y la bacteria se diferencia a bacteroide, el cual es capaz de fijar el nitrógeno molecular.

del mismo, el cual ayuda a atrapar las bacterias localizadas en esta zona y generar un nuevo sitio de crecimiento, ahora hacia adentro del pelo, en forma de túnel (hilo de infección) que crece desde el ápice del pelo hasta la base del mismo (figura 2). Así, las bacterias se desplazan dentro del hilo de infección e incluso se dividen en su trayectoria al interior del pelo; cuando éstas llegan finalmente a las células del primordio de nódulo el cual se ha formado previamente, los rizobios son *exocitados* (liberados) del hilo de infección y al mismo tiempo son *endocitados* (atrapados) por las células vegetales que forman el primordio, dando lugar a la formación de estructuras membranales que contienen intracelularmente a las bacterias, llamadas *simbiosomas* (figura 2). Cuando los rizobios se encuentran dentro de la célula vegetal sufren diversos cambios morfológicos, esenciales para la nueva función que han adquirido. Estos cambios incluyen, entre otros, un aumento en el tamaño de las células y una diferenciación de la bacteria a un estado de bacteroide, en el cual ocurre la fijación del nitrógeno atmosférico. Durante este proceso, la expresión de las nodulinas tardías se incrementa, jugando un papel muy importante en la fisiología del nódulo; tal es el caso de la leghemoglobina, cuya función es la de mantener bajas las tensiones parciales de oxígeno, lo que crea un ambiente microanaeróbico que permite a su vez la actividad de la enzima nitrogenasa del bacteroide y la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Finalmente, los mecanismos moleculares que hacen posible la formación del hilo de infección son aún objeto de intenso estudio.

### Percepción de los factores Nod (cómo se transduce la señal)

Las concentraciones necesarias de los factores Nod para producir las respuestas en los pelos radicales de la planta leguminosa van de  $10^{-6}$  a  $10^{-15}$  M. Esta concentración varía en función de la respuesta inducida y de la interacción rizo-

bio-leguminosa de que se trate. Esto sugiere de inicio que los factores Nod son percibidos por algún tipo de receptor presente en la planta. Mediante la caracterización genética de mutantes incapaces de inducir en los pelos radicales las respuestas previamente descritas, en presencia de los factores Nod, se identificaron genes que codifican receptores tipo cinasas. Estos receptores tipo cinasas se han propuesto como candidatos idóneos para ser los receptores de los factores Nod. Estas cinasas tienen una región transmembranal y una región citoplasmática, esta última con actividad de cinasa (capacidad de transferir un grupo fosfato, es decir de fosforilar). Recientemente se ha postulado que cuando el posible receptor percibe los factores Nod, se da el incremento en los niveles intracelulares de calcio. Este incremento en calcio podría tener dos funciones importantes en la cascada de señalización inducida por los factores Nod. Primero, originar la activación de proteínas sensibles a este ión capaces de fragmentar y reorganizar el citoesqueleto, una respuesta ya descrita en presencia de los factores Nod (Cárdenas *et al.*, 1988). Dentro de las proteínas con esta actividad de fragmentar y reorganizar el citoesqueleto se encuentran la gelsolina y el ADF (*actin depolymerizing factor*). Segundo, este incremento en calcio y las oscilaciones registradas de este ión en la región perinuclear del pelo radical, podrían activar una proteína cinasa dependiente de calcio y calmodulina, localizada en el núcleo del pelo radical, la cual podría estar decodificando las oscilaciones de calcio con diferente magnitud y frecuencia. Se ha propuesto que esta última cinasa podría fosforilar proteínas de una familia de factores transcripcionales, a las cuales se les ha llamado proteínas GRAS. Se ha sugerido que estas proteínas son los activadores transcripcionales de las nodulinas. Sin embargo, se requieren aún más estudios para definir los mecanismos moleculares a través de los cuales la señalización por calcio está ocurriendo en el pelo radical en respuesta los factores Nod.

### Etapas iniciales de la interacción simbiótica frijol-*Rhizobium etli*

Nuestro grupo de trabajo ha realizado contribuciones importantes al campo de estudio de la interacción rizobio-leguminosa, específicamente estudiando la asociación entre frijol y *Rhizobium etli*, su simbiote natural. A la fecha, hemos identificado y caracterizado los genes de nodulación de *R. etli*, encontrando una organización particular de dichos genes en relación a otros rizobios reportados en la literatura. También aislamos y purificamos los factores Nod secretados por *R. etli*, lo cual nos permitió iniciar el estudio de las respuestas celulares de los pelos radicales a estos metabolitos nod *in vivo* (Cárdenas *et al.*, 1995). Así demostramos por vez primera que existen aumentos en los flujos de calcio y un incremento en los niveles intracelulares de este ión en la zona perinuclear de los pelos radicales vivos, segundos después de adicionar los factores Nod específicos (Cárdenas *et al.*, 1999). Estos resultados fueron obtenidos mediante un sistema de microinyección de células vivas, la cual permite introducir compuestos fluorescentes sensibles a calcio; en este caso utilizamos Fura-2. Siguiendo este mismo enfoque se microinyectaron compuestos derivatizados con un marcador fluorescente, como la faloidina, la cual tiene la capacidad de unirse a microfilamentos de actina y permite visualizarlos por microscopia de fluorescencia. Con este enfoque experimental pudimos determinar la participación del citoesqueleto en respuesta a los factores Nod (Cárdenas *et al.*, 1998), encontrando que éste se fragmenta durante los primeros 5 minutos después del tratamiento con los factores Nod para después reorganizarse de acuerdo a la respuesta morfológica del pelo que se trate (hinchamiento y reinicio del crecimiento). Estos resultados indican que el citoesqueleto de actina está involucrado en la vía de percepción de los factores Nod.

Otra herramienta que estamos usando para establecer las etapas tempranas del proceso de

nodulación, es la caracterización molecular y celular de una línea mutante de frijol incapaz de nodular. Los resultados obtenidos a la fecha nos indican que esta mutante no está bloqueada en la percepción de los factores Nod, sino muy posiblemente en un gen que codifica un factor de transcripción que activa la expresión de las nodulinas. Actualmente estamos realizando experimentos que nos permitan o no comprobar esta hipótesis.

También hemos clonado de un banco genómico de frijol, un receptor tipo cinasa con regiones ricas en leucina y, a través de experimentos de inmunodetección (localización de una proteína mediante anticuerpos específicos), proponemos que esta proteína participa en la diferenciación de haces vasculares que comunican al nódulo con la raíz; además, a través de experimentos con ARN de interferencia (inhibición de la expresión de un gen dado) que estamos llevando a cabo, podremos determinar el papel que desempeña esta proteína en la simbiosis frijol-*R. etli*.

Por otro lado, continuamos con el interés de estudiar, a nivel celular y molecular, las respuestas de los pelos radicales al rizobio y a sus metabolitos nod. Para lograr este objetivo, actualmente estamos utilizando técnicas de frontera más poderosas. Esto es, en lugar de microinyectar sondas fluorescentes, hemos implementado el uso de proteínas fluorescentes sensibles a calcio y a especies reactivas de oxígeno; estas últimas para el estudio del estrés oxidativo que postulamos que se está induciendo en respuesta a los factores nod durante los primeros estadios de la interacción simbiótica. Con este objetivo, se están generando plantas transgénicas que expresen estas proteínas fluorescentes en todas sus células, y así poder estudiar *in vivo* las respuestas a *R. etli* y/o a sus factores Nod específicos, a lo largo del proceso de infección y nodulación que eventualmente conllevan a la fijación biológica del nitrógeno. ●

### Bibliografía

Cárdenas, L. *et al.*, "Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*", en *Plant Mol. Biol.*, 29, 1995.

\_\_\_\_\_, "Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals", en *Plant Physiol.*, 116, 1998.

\_\_\_\_\_, "Rhizobium nod factors induce increases in intracellular free calcium and extracellular calcium influxes in bean root hairs", en *Plant J.*, 19, 1999.

\_\_\_\_\_, "Ion changes in legume root hairs responding to nod factors", en *Plant Physiol.*, 123, 2000.