56 Ciencia Nicolaita

Comunicación planta-bacteria basada en ciclodipéptidos de origen microbiano con actividad auxínica

Randy Ortiz Castro, Jesús Campos García y José López Bucio

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. UMSNH.

Resumen

Los microorganismos y sus huéspedes eucariotas se comunican entre sí mediante diferentes señales químicas. Las auxinas, incluyendo el ácido-indol-3-acético (AIA), son hormonas importantes en muchos aspectos del desarrollo de las plantas. Los ciclodipéptidos y sus derivados las dicetopiperazinas (DCPs) constituyen una clase novedosa de moléculas pequeñas sintetizadas por microorganismos. En este trabajo presentamos evidencia de que en la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* el sistema de percepción de quórum (quorum-sensing; QS) LasI controla la producción de tres DCPs, ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Tyr), que participan en la estimulación del crecimiento vegetal. El análisis del efecto de los compuestos en plantas de *Arabidopsis thaliana*mostró cambios en la respuesta auxínica, afectando la arquitectura radicular y modificando la expresión de genes regulados por AIA en las plantas silvestres pero no en las mutantes afectadas en la señalización de auxinas *tir1, tir1afb2afb3, arf7, arf19* y *arf7arf19*. Los resultados obtenidos indican que la producción bacteriana de DCPs está regulada por el QS, que éstos compuestos modulan las vías de señalización de las auxinas y promueven el crecimiento vegetal,

permitiendo proponer una importante función de las DCPs en la comunicación planta-bacteria.

***Palabras clave*:** auxinas, raíces laterales, pelos radiculares, fitoestimulación, dicetopiperazinas.

Abstract

Microorganisms and their eukaryotic hosts communicate through an array of chemical signals. Auxins, including indole-3-acetic acid (IAA) are hormones that participate in many developmental processes in plants. Cyclodipeptides and their derivate diketopiperazines (DCPs) belong to a novel class of small molecule signals, which are produced by bacteria. In this work, an *in vitro* system was established to study the interactions of bacteria with plants and their impact on plant growth. We present evidence that in *Pseudomonas aeruginosa*, the LasI quorum-sensing (QS) system controls the production of three DCPs, cyclo(L-Pro-L-Val), cyclo(L-Pro-L-Phe) y cyclo (L-Pro-L-Tyr), that promote biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. Analysis of the effects of all three compounds in seedlings showed that they activate auxin responses, alter root architecture and auxin-regulated gene expression in WT seedlings but not in *tir1, tir1afb2afb3, arf7, arf19* y *arf7arf19* auxin-related mutants. Our observations that bacterial production of DCPs is negatively regulated by QS and that DCPs modulate auxin signaling to promote plant development establish an important function of DCPs in plant-bacteria communication.

***Keywords*:** auxins, lateral roots, root hairs, phytostimulation, diketopiperazines.

Introducción

Un campo reciente y fundamental de la biología se relaciona con el estudio de los procesos que regulan la interacción entre las bacterias y los eucariontes. Este campo se ha visto influenciado con la observación inicial de que las bacterias pueden comunicarse a través de señales moleculares, en un proceso conocido como quorum-sensing (QS; Fuqua et al., 1996). Diferentes evidencias indican que estas señales o moléculas bacterianas pueden modular la transducción de señales en mamíferos (Telford et al., 1998) y plantas (Mathesius et al., 2003), y por otro lado, las hormonas del huésped pueden afectar la expresión de genes bacterianos (Sperandio et al., 2003; Gao et al., 2003). Un grupo muy importante de moléculas pequeñas descritas en procesos de QS bacteriano, denominadas autoinductores, entre las cuales se encuentran las *N*-acil-homoserinalactonas (AHLs), se sintetizan a partir de la S-adenosil metionina y de proteínas acarreadoras de ácidos grasos por las sintasas de AHLs (Pearson et al., 1994; Pearson et al., 1995; Fuqua et al., 1996). Las AHLs contienen un grupo homoserinalactona y una cadena de ácido graso de longitud variable que ayuda en la libre difusión a través de las membranas bacterianas, y ya en el citoplasma se unen a facto-

res transcripcionales para regular la transcripción de genes relacionados con el proceso de QS (Fuqua et al., 1996; Sperandio et al., 2003).

Las bacterias, tanto patógenas como simbiontes de las plantas, requieren del QS para comunicarse satisfactoriamente con sus huéspedes (Hussain et al., 2008; Rosemeyer et al., 1998). Las plantas por otra parte, han desarrollado múltiples mecanismos para percibir estas señales químicas. Por ejemplo, concentraciones micromolares de AHLs afectan sustancialmente la expresión de genes en *Medicago truncatula* y *Arabidopsis thaliana* impactando en el metabolismo primario, en las respuestas hormonales y en la arquitectura del sistema radicular (Mathesius et al., 2003; von Rad et al., 2008; Ortiz-Castro et al., 2008). Las bacterias que habitan la rizósfera pueden influir sobre el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas, tales como el ácido indol-3-acético (AIA), la principal auxina natural (Spaepen et al., 2007). La aplicación del AIA o metabolitos relacionados estimula la formación de raíces laterales y pelos radiculares, los cuales participan en la captación de agua y nutrientes y esto permite un incremento en la producción de biomasa (Spaepen et al., 2007). En consonancia con lo anterior, varias mutantes de *A. thaliana* afectadas en el transporte, percepción o señalización de auxinas, incluyendo *aux1*, *axr2*, *tir1* y *tir3/doc1/big*, manifiestan una reducción en la formación de raíces laterales y en el tamaño de la planta (Woodward et al., 2005).

La comunicación planta-bacteria puede ocurrir por medio de diferentes compuestos, algunos de los cuales mimetizan la actividad de fitohormonas endógenas. Los ciclodipéptidos y sus derivados las dicetopiperazinas (DCPs) constituyen una clase novedosa de moléculas pequeñas sintetizadas por microorganismos a las cuales se les ha encontrado diversas funciones biológicas. Por ejemplo, los compuestos ciclo (L-Phe-L-Pro) y ciclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) actúan como antifúngicos (Ström et al., 2002). Por otra parte, la epipolitiodioxopiperazina muestra propiedades antitumorales, antibacterianas, antivirales e inmunosupresoras (Kanoh et al., 1999; Williams et al., 1998). Estos compuestos se sintetizan por una familia de enzimas llamadas ciclodipéptidosintetasas (Gondry et al., 2009). Aunque las DCPs son moléculas bioactivas notables, existe poca información concerniente a su biosíntesis en bacterias y su papel en la comunicación con las plantas.

En este trabajo presentamos evidencia que en *P. aeruginosa*, el sistema de QS dependiente de la AHL-sintasa LasI, controla la producción de los DCPs ciclo(L-Pro-L-Val), ciclo(L-Pro-L-Phe) y ciclo(L-Pro-L-Tyr), los cuales están involucrados en la estimulación del crecimiento vegetal por esta bacteria, mediante la activación de una respuesta auxínica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas silvestres de *A. thaliana* (Col-0), las líneas transgénicas *DR5:uidA* (Ulmasov et al., 1997), *BA3:uidA* (Oono et al., 1998), *HS::AXR3NT-GUS* (Dhar-

masiri et al., 2005a), y las mutantes *tir1-1*, *tir1afb2afb3* (Dharmasiri et al., 2005b) y *arf7-1*, *arf19-1*, *arf7arf19* (Okushima et al., 2007). Las semillas se desinfectaron superficialmente con etanol al 95% (v/v) por 5 min e hipoclorito al 20% por 7 min. Después de cinco enjuagues con agua destilada esterilizada, las semillas fueron germinadas y crecidas en medio Murashige y Skoog (MS) 0.2x carente de aminoácidos y vitaminas (Murashige y Skoog basal salts mixture; Sigma). La formulación sugerida es de 4.3 g/L de sales para una concentración del medio de 1x. Se utilizó 0.9 g/L para referir a la solución MS 0.2x. El phytagar (grado micropropagación) fue adquirido de la casa comercial Phytotechnology. Las plantas fueron colocadas en una cámara de crecimiento (Percival Scientific AR-95L) con un fotoperiodo de 16 h de luz, 8 h de oscuridad, con una intensidad luminosa de 10 mol y una temperatura de 22 ^{o}C.

Ensayo *in vitro* de co-inoculación bacteriana de la raíz

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo fueron *P. aeruginosa* PAO1 (cepa silvestre), *P. Aeruginosa lasI*$^{-}$, *rhlI*$^{-}$ y *rhlI*$^{-}$*/lasI*$^{-}$ mutantes sencillas y dobles, respectivamente (Li et al., 2007). Las cepas bacterianas fueron evaluadas *in vitro* en la estimulación del crecimiento vegetal, utilizando el ecotipo de *A. thaliana* Col-0. Se inocularon densidades bacterianas de 2.5x10^{8} UFC (unidades formadoras de colonias) mediante estriado sobre placas con medio MS 0.2x sólido. Plántulas de 6 días después de la germinación (8 plántulas por placa) fueron crecidas en el lado opuesto al sitio de inoculación bacteriana. La inoculación se realizó a una distancia de 5 cm de la punta de la raíz. Las plántulas fueron crecidas durante 8 días colocando las placas en una cámara de crecimiento bajo un diseño aleatorio. Todos los experimentos fueron repetidos al menos tres veces.

Tratamientos con hormonas vegetales y ciclodipéptidos

Para todos los experimentos, el medio MS fue suplementado con AIA (Sigma) o DCPs. Los compuestos fueron disueltos en etanol y se agregaron al medio a una temperatura de 50 ^{o}C y posteriormente vaciado en cajas de Petri. Las DCPs fueron purificadas del medio de cultivo Luria Bertani (LB) en el cual se creció la cepa mutante de *P. Aeruginosa lasI*$^{-}$.

Análisis del crecimiento y estadística

El crecimiento de las raíces primarias se registró utilizando una regla. El número de raíces laterales (RL) fue contado desde la punta de la raíz primaria hasta la transición de la raíz y el tallo. La densidad de raíces laterales (DRL) se determinó dividiendo el número de raíces laterales entre la longitud de la raíz primaria y expresada como DRL/cm. El peso fresco de las plantas se cuantificó pesando el material en una balanza analítica. Para todos los experimentos, los datos fueron analizados estadísticamente en el programa SPSS-10. Se realizaron análisis univariados y multivariados con una prueba de Tukey para estimar las diferencias de las respuestas.

Análisis histoquímico de la actividad de β-glucuronidasa (GUS)

Las plantas transgénicas que expresan el gen reportero *uidA* (Jefferson et al., 1987) fueron teñidas en 0.1% de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolil, -D-glucurónido) en amortiguador de fosfatos (NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4, 0.1 M, pH 7) suplementado con 2 mM de ferrocianuro de potasio, por 12 h a 37 ^oC. Las plantas se clarificaron y fijaron de acuerdo al protocolo de Malamy y Benfey (1997). Las raíces así procesadas fueron incluidas en un portaobjetos para su análisis microscópico. Se analizaron al menos 10 plantas transgénicas de cada línea marcadora y en cada tratamiento.

Análisis microscópico de plantas

El sistema radicular de *A. thaliana* se estudió con un microscopio estereoscópico (Leica MZ6). El número de raíces laterales totales se estimó bajo un aumento de 30X. Los meristemos de las raíces laterales se visualizaron en preparaciones semi-permanentes de raíces clarificadas usando un microscopio compuesto (AxiostarZeiss Plus) a un aumento de 100X o 400X. Las imágenes se capturaron con una cámara digital Sony Cyber-shot DSC-S75 adaptada al microscopio y procesadas con el programa Zeiss Axio Vision 4AC (Carl Zeiss).

Extracción, purificación y caracterización de los ciclo-dipéptidos de *P. aeruginosa*

Se inoculó 1.5 L de medio de cultivo Luria Bertani con un cultivo crecido de *P. aeruginosa* PAO1 y de la mutante *lasI* ($2.5x10^8$ UFC) en una cámara de crecimiento con agitación (125 rpm) por 24 h a 37^{o}C. El cultivo bacteriano se centrifugó a 10,000x g por 10 min a 25^{o}C en una centrífuga Eppendorf 5810R. El cultivo bacteriano libre de células se extrajo con dos volúmenes de acetato de etilo acidificado con ácido acético (0.1 mL/L). Los extractos se evaporaron utilizando un rotavapor a 60^{o}C. El residuo fue concentrado con metanol:acetonitrilo (1:1) y disuelto en 1 mL de acetonitrilo grado HPLC.

Para la purificación de las DCPs, 1 mL del extracto obtenido con acetato de etilo fue separado en un sistema de HPLC utilizando una columna semi-preparativa C_{18} (Econosil C_{18}, Alltech). En el proceso de separación se utilizó el sistema de solventes agua:acetonitrilo, comenzando el programa de corrimiento con un paso de calibración 100:0, seguido por un gradiente linear 60:40, con un flujo de 8 mL min^{-1} por 25 min; un gradiente linear de 40:60, con un flujo de 8 mL min^{-1} por 3 min; un gradiente linear de 100:0 con un flujo de 8 mL min^{-1}por 3 min y terminando con una calibración de 12 minutos con un flujo de 8 mL min^{-1}. Los diferentes picos identificados se colectaron y las fracciones fueron concentradas por liofilización. Las fracciones colectadas y purificadas fueron posteriormente usadas para la evaluación de su actividad biológica y análisis estructural.

Las fracciones se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en un equipo de GC Agilent 6850 Series II con un detector de MS Agilent modelo 5973, y una columna capilar HP-5 MS. Las condiciones de operación fueron:

helio como gas acarreador, 1 mL/min; una temperatura de detección a 300 °C y una temperatura de inyección de 250 °C. El volumen de la muestra inyectada fue de 1 µL. Se mantuvo la columna por 3 min a 80 °C y se programó una rampa a 6°C/min a una temperatura final de 230 °C sostenida durante 5 min. Se utilizó un análisis SCAN para verificar la presencia de los ciclodipéptidos. La espectrometría de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^{1}H-NMR) y de carbono (^{13}C-NMR) se realizó con el magneto de ^{1}H-NMR (Varian 400 MHz) y magneto de ^{13}C-NMR (Varian 100 MHz), respectivamente (Ortiz-Castro et al., 2011).Las muestras a analizar (1 mg) fueron disueltas en $CDCL_3$. Las respectivas estructuras fueron determinadas mediante un análisis estructural comparativo con bases de datos y compuestos comerciales de estructura conocida.

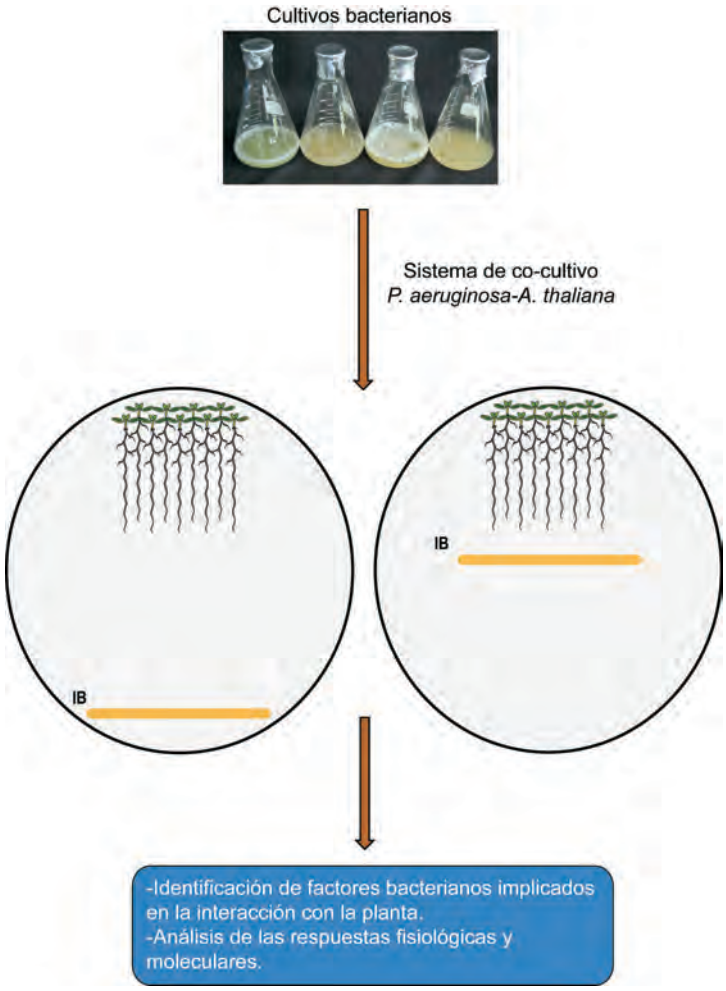

Figura 1.Sistema de co-cultivo para la identificación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. Se muestra el diseño implementado en estos estudios, con aplicación del inóculo bacteriano (IB) mediante una estría lineal a 5 cm o 1 cm de la punta de la raíz primaria.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estimulación del crecimiento vegetal por compuestos producidos por *Pseudomonas aeruginosa*

En *P. aeruginosa* se han descrito dos sistemas de QS dependientes de AHLs, los sistemas *las* y *rhl*. En el sistema *las*, la sintasa de AHLs LasI dirige la síntesis del compuesto 3-oxo-C12-AHL, el cual interacciona con el factor transcripcional LasR para unirse a los promotores de los genes blanco. En el sistema *rhl*, la sintasa RhlI dirige la síntesis de C4-AHL, la

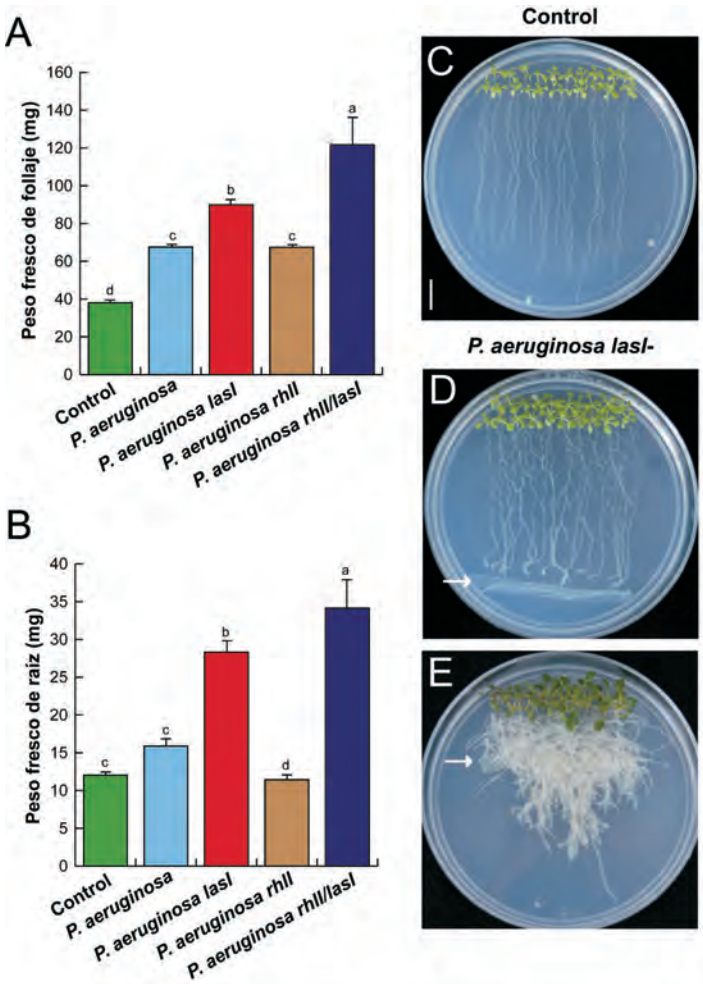

Figura 2. Efecto de *P. aeruginosa* PAO1 y cepas mutantes afectadas en la producción de AHLs sobre el desarrollo de la raíz y la estimulación del crecimiento vegetal. Plántulas de *A. thaliana* de 6 días de edad se inocularon con *P. aeruginosa* PAO1 o mutantes afectadas en las sintasas de AHLs *LasI*, *RhlI*, o *RhlI/LasI* a una distancia de 5 cm de la punta de la raíz primaria y crecidas por un periodo adicional de 8 días.(A) Efecto de la co-inoculación bacteriana sobre la producción de biomasa de follaje o (B) la biomasa de raíz. (C-E) Fotografías representativas del crecimiento en condiciones axénicas. (C) Co-inoculadas con la mutante de *P. Aeruginosa lasI* a una distancia de la raíz primaria de 5 cm (D) o 1 cm (E) (Escala de la barra = 1 cm). La flecha indica el sitio donde se realizó la inoculación bacteriana. Los datos representan la media D.E. (n = 30). Las diferentes letras indican diferencia estadística con una $P<0.05$.

cual interacciona con el regulador RhlR para controlar la transcripción de sus respectivos genes blanco (Pearson et al., 1994; Pearson et al., 1995; Pesci et al., 1997).

Inicialmente se evaluó el efecto de *P. aeruginosa* sobre el crecimiento vegetal utilizando un sistema de co-cultivo *in vitro* evaluando la co-inoculación bacteriana con plantas de *A. thaliana* mediante un estriado bacteriano a una distancia larga (5 cm) o corta (1 cm; Fig. 1). Para analizar el efecto de la bacteria en el crecimiento vegetal, plantas de *A. thaliana* de 4 días de edad crecidas en medio MS 0.2x se inocularon con 2.8 x 10^8 UFC de *P. aeruginosa* (PAO1) y mutantes de *P. aeruginosa* afectadas en las sintasas de AHLs (*lasI*¯, *rhlI*¯) y la doble mutante *rhlI*¯*/lasI*¯ mediante un estriado de cada bacteria (IB, inóculo bacteriano) sobre la su-

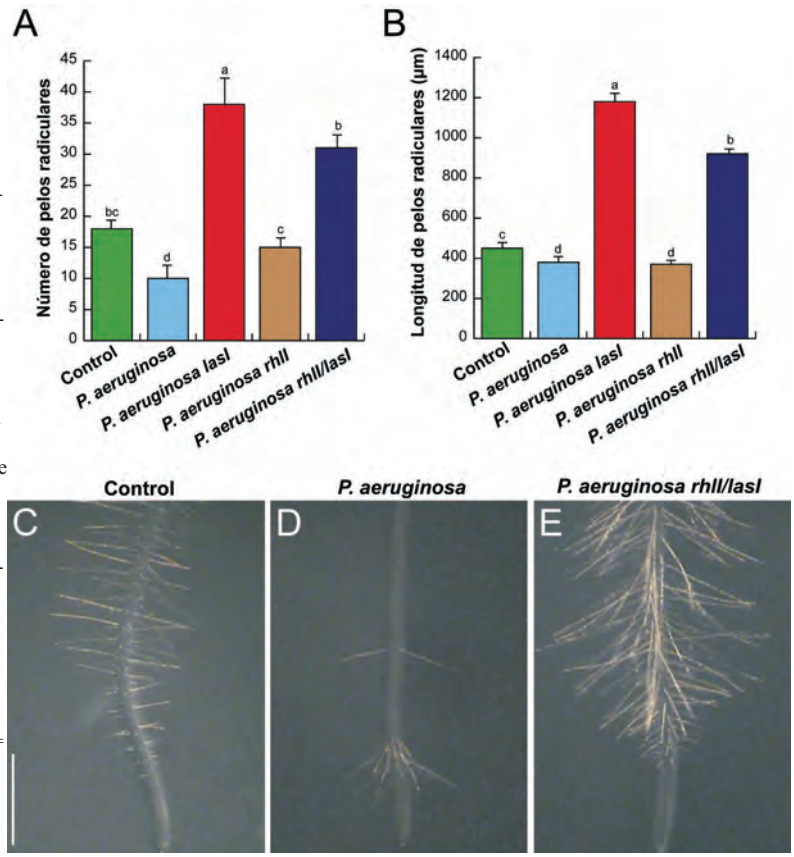

Figura 3. Efecto de *P. aeruginosa* PAO1 y mutantes afectadas en la producción de AHLs sobre el desarrollo de los pelos radiculares. Plántulas de *A. thaliana* de 4 días de edad se inocularon con *P. aeruginosa* PAO1 o mutantes afectadas en las sintasas de AHLs *LasI*¯, *RhlI*¯, o *RhlI*¯*/LasI*¯ a una distancia de 5 cm de la punta de la raíz primaria y se crecieron por un periodo adicional de 8 días. (A) Efecto de la co-inoculación bacteriana en el número de pelos radiculares ó (B) longitud de los pelos radiculares. Datos de A y B muestran la media D.E. de 30 plántulas. Diferentes letras indican diferencia estadística a P<0.05. (C-E) Fotografías representativas de plántulas de *A. thaliana*crecidas axénicamente(C), o inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 (D) o la doble mutante de *P. Aeruginosa rhlI*¯*/lasI*¯(E). (Barra de escala = 500 µm).

perficie del medio a una distancia de la punta de la raíz de 5 cm o 1 cm. Después de 8 días de crecimiento en presencia de la bacteria, se observó un incremento en la producción de biomasa en follaje y raíz (Fig. 2A y 2B), el cual se correlacionó con una arquitectura del sistema radicular alterada (Fig. 2C-E). Interesantemente, la mutante *lasI*¯ mostró el mayor efecto estimulador en la producción de biomasa de follaje y raíz aparentemente asociado con una inducción prolífica de raíces laterales (Fig. 2E) y pelos radiculares (Fig. 3A-E). Estos resultados sugieren que las AHLs producidas por la sintasa LasI modulan la producción de algún(os) compuesto(s) directamente involucrado(s) en la regulación del desarrollo vegetal, así como en procesos de división y diferenciación celular en la raíz de *A. thaliana*.

Las DCPs producidas por *P. aeruginosa* estimulan el desarrollo de raíces laterales en *A. thaliana*

Diversas especies bacterianas producen compuestos auxínicos como el AIA (Spaepen et al., 2007). Para determinar si esta(s) u otra(s) sustancia(s) podrían encontrarse en el sobrenadante de cultivos de *P. aeruginosa,* se realizó la extracción de los compuestos activos y se evaluó su efecto sobre la formación de raíces laterales mediante el conteo de primordios. Después de someter los extractos totales a separación por HPLC y colección de fracciones, se identificaron tres fracciones activas (P6, P7 y P8). La caracterización molecular de los extractos purificados P6, P7 y P8 se realizó mediante espectroscopía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) y confirmada por análisis de los espectros de ^{1}H NMR y ^{13}C NMR. En estos extractos se evidenció la presencia mayoritaria (> 95%) de tres DCPs, ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) (Fig. 4A-C). Las DCPs encontradas se acumularon en los extractos de la mutante de *P. Aeruginosa lasI*¯y en la doble mutante *rhlI*¯*/lasI*¯ (Fig. 4D). Estos hallazgos muestran que en las mutantes de *P. Aeruginosa lasI*¯ y *rhlI*¯*/lasI*¯, se incrementan las concentraciones de las DCPs, lo cual sugiere que la biosíntesis de estos compuestos está regulada por el sistema de QS dependiente de LasI. Aunque un efecto biológico directo sobre *A.thaliana* es la modulación del desarrollo, la función que puedan estar jugando las DCPs en los mecanismos de comunicación molecular de *P. aeruginosa* con otras bacterias permanece sin dilucidar.

Las DCPs bacterianas modulan respuestas auxínicas en *A. thaliana*

El crecimiento de las raíces laterales y la formación de pelos radiculares están altamente regulados por auxinas (Woodward et al., 2005). El sistema heterocíclico peculiar de las DCPs está presente en el AIA y otros compuestos con actividad auxínica (Calderón-Villalobos et al., 2010). El hallazgo de que la inoculación de plantas de *A. thaliana* con las mutantes *lasI*¯ *y rhlI*¯*/lasI*¯causa en las plantas un incremento en la formación de raíces laterales y pelos radiculares nos condujo a evaluar si las DCPs actúan mimetizando señales tipo auxina. Para esto, se utilizaron plantas transgénicas que expresan el marcador inducible por auxinas *DR5:uidA*(Ulmasov et al., 1997), mismas que fueron co-inoculadas con *P. aeruginosa* (PAO1) o la mutante *lasI*¯. En las plantas crecidas en condiciones axénicas, el marcador

DR5:uidA se expresó principalmente en la punta de la raíz (Fig. 5). Por un lado, las plantas suplementadas con 3 µM de AIA mostraron una fuerte actividad de GUS a lo largo de toda la raíz primaria (Fig. 5B), indicando la inducción de la respuesta auxínica, mientras que el patrón de expresión de GUS en plantas co-inoculadas con *P. aeruginosa* (PAO1) fue similar al observado en condiciones axénicas (Fig. 5C). En contraste, en plantas co-inoculadas con la mutante de *P. Aeruginosa lasI*$^-$, se observó un claro incremento en la expresión de este marcador en toda la raíz primaria (Fig. 5D), indicando que el sistema de QS LasI regula la biosíntesis de compuestos con actividad auxínica.

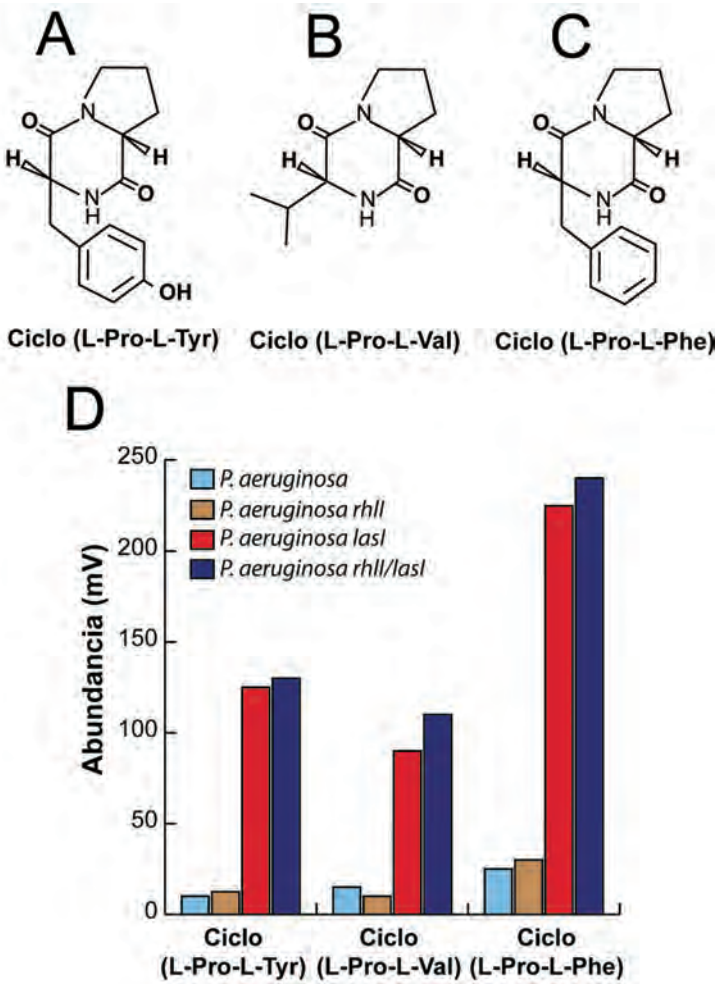

Figura 4. Identificación y caracterización de DCPs producidas por *P. aeruginosa*. *P. aeruginosa* PAO1 y mutantes afectadas en las sintasas de AHLs *LasI*$^-$, *RhlI*$^-$, o *RhlI*$^-$*/LasI*$^-$ fueron crecidas en medio LB por 24 h y posteriormente el sobrenadante del cultivo se extrajo con acetato de etilo. Los extractos se fraccionaron y purificaron mediante HPLC. Se caracterizaron tres fracciones activas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), identificándose tres DCPs, **(A)** ciclo (L-Pro-L-Val; m/z = 196), **(B)** ciclo (L-Pro-L-Phe; m/z = 244), y **(C)** ciclo (L-Pro-L-Tyr; m/z = 260). **(D)** Abundancia relativa de las DCPs determinada por GC/MS. Los datos representan la media de la abundancia relativa (x10^7 mV).

Posteriormente, se evaluó la actividad de las tres DCPs sobre la expresión del marcador *DR5:uidA* en raíces mediante la transferencia de plantas de 6 días de edad a medios líquidos suplementados con AIA o DCPs, respectivamente. En la figura 5E se muestra la tinción histoquímica de plantas transgénicas *DR5:uidA* tratadas con AIA o las diferentes DCPs. Estos ensayos permitieron observar un aumento en la expresión de GUS en plantas tratadas con las DCPs, indicando la inducción de la respuesta auxínica, aunque en menor grado comparada con plantas tratadas con AIA (Fig. 5E).

Las auxinas actúan mediante su interacción con la proteína TIR1 (*transport inhibitor response1,* por sus siglas en inglés), un miembro de una familia pequeña de proteínas F-box

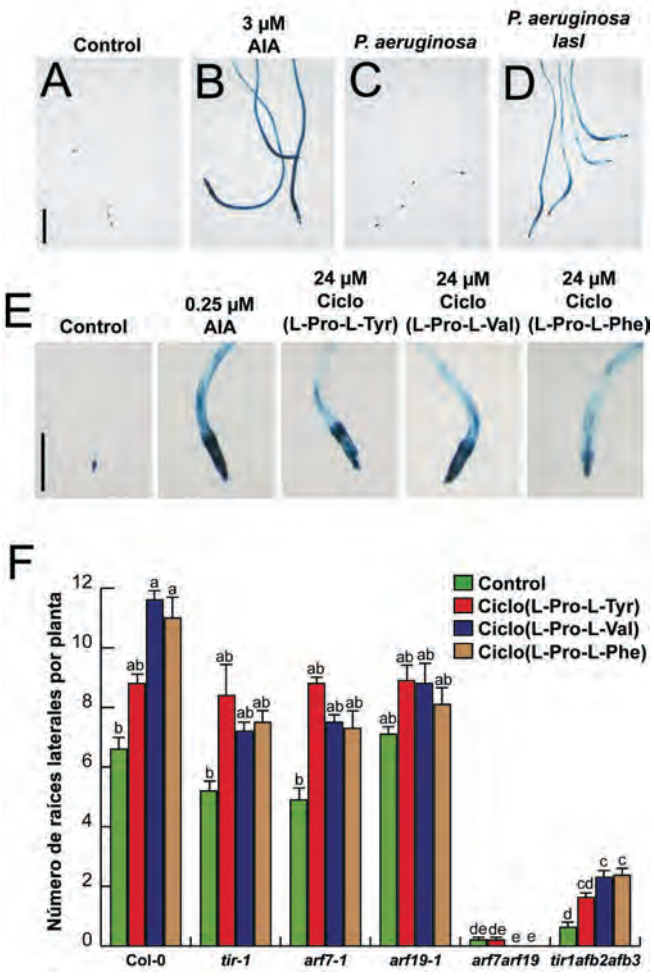

Figura 5. Efecto de las DCPs bacterianas en la respuesta auxínica en *A. thaliana*.(A-B) Expresión del marcador inducible por auxinas *DR5:uidA* en plantas transgénicas control **(A)**, con 3 µM AIA **(B)**, co-inoculadas con *P. aeruginosa* PAO1 **(C)** o con la mutante de *P. Aeruginosa lasI* **(D)**. **(E)** Efecto del AIA o DCPs purificadas sobre la expresión de *DR5:uidA.* Las fotografías muestran plantas representativas (Barra de escala = 500 µm). **(F)** Número de raíces laterales en plantas silvestres de *A. thaliana* y líneas mutantes *tir1-1*, *arf7-1,arf19-1*, *arf17arf19* y *tir-1afb2afb3*germinadas y crecidas en medio MS 0.2x solidificado por 6 días y posteriormente transferidas a medios líquidos MS 0.2x suplementados con 30 µM de cada DCP y tratadas por dos días. Los datos muestran la media D.E. Las diferentes letras indican diferencia estadística a $P< 0.05$.

(Dharmasiri et al., 2005b; Kepinski et al., 2005). En esta interacción se acelera la degradación catalizada por la ubiquitina ligasa de las proteínas represoras Aux/AIA, permitiendo la activación de genes regulados por factores de respuesta a auxinas (ARFs; *auxin response factors*) (Gray et al., 2001). Para determinar si los receptores de auxinas de la familia TIR1 y ARFs están involucrados en las respuestas de *A. thaliana* a las DCPs, se cuantificó la formación de raíces laterales en respuesta a ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) en plantas silvestres y en las mutantes *tir1-1* y *tir1afb2afb3*, *arf7-1, arf19-1* y *arf7arf19*. En plantas silvestres tratadas con el compuesto ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) se incrementó el número de raíces laterales por planta (Fig. 5F). La mutante *tir1-1* mostró una reducción de un 25% en el número de raíces laterales, con respecto al observado en plantas silvestres. Interesantemente, el incremento en la formación de raíces laterales observado en plantas silvestres tratadas con DCPs disminuyó en la mutante *tir1-1* (Fig. 5F). En la mutante *tir1afb2afb3*, la formación de raíces laterales no fue estimulada por el tratamiento con las DCPs (Fig. 5F). La mutante sencilla *arf7-1* muestra reducción en el número de raíces laterales comparado con las plantas silvestres; además, la estimulación de la formación de raíces laterales por las DCPs disminuyó en las mutantes *arf7-1* y *arf19-1* (Fig. 5F). Estos resultados sugieren que las DCPs muestran actividad auxínica y requieren para su efecto de una ruta de señalización intacta de auxinas.

Conclusiones

En este trabajo, se exploró genéticamente el papel del QS en *P. aeruginosa* en su interacción con la planta modelo *A. thaliana* mediante un sistema de co-cultivo *in vitro* (Fig. 1). Encontramos que la producción de biomasa en follaje y raíz se incrementó en plantas co-inoculadas con *P. aeruginosa*. Es importante resaltar la alta capacidad de estimulación de la mutante *lasI*¯ a una corta distancia del sistema radicular (Fig. 2). Estos resultados complementan reportes previos en los que se había mostrado que *P. aeruginosa* causa efectos dañinos en *A. thaliana* (Rahme et al., 1995; Plotnikova et al., 2000; Walker et al., 2004). Rahme et al., (2005) evaluó una colección de 75 cepas de *P. aeruginosa* potencialmente dañinas en hojas de cuatro ecotipos de *A. thaliana*, analizando su patogenicidad mediante infiltraciones de bacterias dentro del tejido vegetal. Estos autores encontraron que solamente dos cepas UCBPP-PA14, un aislado de humanos, y UCBPP-PA29, un aislado de plantas, causaron síntomas de ablandamiento de tejido, posiblemente por la secreción de enzimas digestivas y factores de virulencia, características que en *P. aeruginosa* se conocen a detalle y están regulados por los sistemas de QS. En contraste, información de otros grupos ha resaltado el potencial de algunas cepas ambientales de *P. aeruginosa* como un bio-inoculante (Preston, 2004), lo cual, con base en nuestros hallazgos, permite proponer que el comportamiento de *P. aeruginosa* como un patógeno o como una bacteria promotora del crecimiento vegetal dependerá del geno- y fenotipo de esta especie.

Por otro lado, en los experimentos realizados no se detectó AIA en los extractos bacterianos. Sin embargo, se encontraron tres DCPs producidas mayoritariamente en cultivos

de *P. aeruginosa*, cuya biosíntesis está regulada negativamente por el sistema de QS LasI. Cada compuesto se purificó y su estructura fue confirmada por GC-MS y NMR, llegando a la identificación de los compuestos ciclo(L-Pro-L-Tyr), ciclo(L-Pro-L-Val) y ciclo(L-Pro-L-Phe) (Ortíz-Castro et al., 2011). Los efectos del AIA y las DCPs sobre la expresión de genes regulados por auxinas en *A. thaliana* sugiere que las tres DCPs muestran una actividad auxínica débil comparada con el AIA (Fig. 5). Los hallazgos de que las DCPs no estimulan la formación de raíces laterales en la triple mutante de los receptores de auxinas *tir1afb2afb3* y la doble mutante en los factores de transcripción *arf7arf19* que median la señalización cascada abajo al receptor TIR1 de *A. thaliana* (Fig. 5), sugiere que estos compuestos requieren para su efecto de una ruta de señalización auxínica. Lo anterior establece una importante función de los DCPs de origen microbiano en la comunicación planta-bacteria. La manipulación de la señalización del QS dependiente de AHLs y la biosíntesis de DCPs puede ser una estrategia prometedora para el desarrollo de inoculantes bacterianos que incrementen la producción de cultivos por medio de una modulación de la señalización de auxinas y la regulación de la arquitectura radicular.

Agradecimientos

Agradecemos a los Drs. Peter Doerner, Chrintian Lusching, Athanasios Theologis, Tom Guilfoyle y Mark A. Estelle por su generosa donación de semillas, líneas transgénicas y mutantes de *A. thaliana*. A la Dra. Barbara Iglewski por proporcionarnos las cepas de *P. aeruginosa*. Agradecemos a los Dres. Rosa E. del Río Torres, César Díaz Pérez y Miguel Martínez Trujillo, por sus diferentes aportes al desarrollo de esta investigación. Este trabajo fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyectos 80916 y 106567, el Consejo de la Investigación Científica 2.26 y 2.14, y la Fundación Marcos Moshinsky A.C.

Bibliografía

Calderón-Villalobos L.I., X. Tan, N. Zheng, M. Estelle. 2010. Auxin perception-structural insights. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 2:a005546.

De Lano W.L. 2002. The PyMol Molecular Graphics System. De Lano Scientific, Palo Alto, CA, USA.

Dharmasiri N., S. Dharmasiri, M. Estelle. 2005a. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature 435:441-445.

Dharmasiri N., S. Dharmasiri, D. Weijers, E. Lechner, M. Yamada, L. Hobbie, J.S. Ehrismann, G. Jürgens, M. Estelle. 2005b. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. Developmental Cell 9:109-119.

Fuqua C., S.C. Winans, E.P. Greenberg. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. Annu. Rev. Microbiol. 50:727-751.

Gao M.M., M. Teplitski, J.B. Robinson, W.D. Bauer. 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. Mol. Plant-Microbe Interact.16:827-834.

Gondry M., L. Sauguet, P. Belin, R. Thai, R. Amouroux, C. Tellier, K. Tuphile, M. Jacquet, S. Braud, M. Courçon, C. Masson, S. Dubois, S. Lautru, A. Lecoq, S. Hashimoto, R. Genet, J.L. Pernodet. 2009. Cyclodipeptide synthases are a family of tRNA dependent peptide bond-forming enzymes. Nature Chem. Biol. 5:414-420.

Gray W.M., S. Kepinski, D. Rouse, O. Leyser, M. Estelle. 2001. Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. Nature 414:271-276.

Hayashi K., X. Tan, N. Zheng, T. Hatate, Y. Kimura, S. Kepinski, H. Nozaki. 2008. Small-molecule agonists and antagonists of F-box protein-substrate interactions in auxin perception and signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:5632-5637.

Hussain M.B., H.B. Zhang, J.L. Xu, Q. Liu, Z. Jiang, L.H. Zhang. 2008. The acyl-homoserine lactone-type quorum-sensing system modulates cell motility and virulence of *Erwinia chrysanthemi* pv. zeae. J. Bacteriol. 190:1045-1053.

Jefferson R.A., T.A. Kavanagh, M.W. Bevan. 1987. GUS fusion: β-glucuronidase as a sensitive and versatile fusion marker in higher plants. EMBO J. 6:3901-3907.

Kanoh K., S. Kohno, J. Katada, Y. Hayashi, M. Muramatsu, I. Uno. 1999. Antitumor activity of phenylahistin *in vitro* and *in vivo*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63:1130-1133.

Kepinski S., O. Leyser. 2005. The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature 435:446-451.

Li L.L., J.E. Malone, B.H. Iglewski. 2007. Regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulator VqsR. J. Bacteriol. 189:4367-4374.

Malamy J.E., P.N. Benfey. 1997. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. Development 124:33-44.

Mathesius U., S. Mulders, M. Gao, M. Teplitski, G. Caetano-Anollés, R.G. Rolfe, W.D. Bauer. 2003. Extensive and specific responses of a eukaryote to bacterial quorum-sensing signals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:1444-1449.

Okushima Y., H. Fukaki, M. Onoda, A. Theologis, M. Tasaka. 2007. ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in *Arabidopsis*. Plant Cell 19:118-130.

Oono Y., Q.G. Chen, P.J. Overvoorde, C. Köhler, A. Theologis. 1998. Mutants of Arabidopsis exhibit altered auxin-regulated gene expression. Plant Cell 10:1649–1662.

Ortiz-Castro R., M. Martínez-Trujillo, J. López-Bucio. 2008. *N*-acyl-L-homoserine lactones: A class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Environ. 31:1497-1509.

Ortiz-Castro R., Díaz-Pérez C., Martínez-Trujillo M., del Río, Campos-García J, López-Bucio J. 2011. Transkingdom signaling based on bacterial cyclodipeptides with auxin activity in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108 (17): 7253-7259.

Pearson J.P., K.M. Gray, L. Passador, K.D. Tucker, A. Eberhard, B.H. Iglewski, E.P. Greenberg. 1994. Structure of the autoinducer required for expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:197-201.

Pearson J.P., L. Passador, B.H. Iglewski, E.P. Greenberg. 1995. A second *N*-acylhomoserine lactone signal produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1490-1494.

Pesci E.C., J.P. Pearson, P.C. Seed, B.H. Iglewski. 1997. Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 179:3127-3132.

Plotnikova J.M., L.G. Rahme, F.M. Ausubel. 2000. Pathogenesis of the human opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PA14 in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 124:1766-1774.

Preston G.M. 2004. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. Philosophical Trans. Royal Soc. Lond B Biol. Sci. 359:907-918.

Rahme L.G., E.J. Stevens, S.F. Wolfort, J. Shao, R.G. Tompkins, F.M. Ausubel. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. Science 268:1899-1902.

Rosemeyer V., J. Michiels, C. Verreth, J. Vanderleyden. 1998. *luxI*- and *luxR* homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. J. Bacteriol. 180:815-821.

Sanner M.F. 1999. Python: a programming language for software integration and development. J. Mol. Graph. Model. 17:57-61.

Spaepen S., J. Vanderleyden, R. Remans. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol. Rev. 31:425-448.

Sperandio V., A.G. Torres, B. Jarvis, J.P. Nataro, J.B. Kaper. 2003. Bacteria-host communication: The language of hormones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:8951-8956.

Ström K., J. Sjögren, A. Broberg, J. Schnürer. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. Appl. Environ. Microbiol. 68:4322-4327.

Tan X., L.I. Calderon-Villalobos, M. Sharon, C. Zheng, C.V. Robinson, M. Estelle, N. Zheng. 2007. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. Nature 446:640-645.

Telford G., D. Wheeler, P. Williams, P.T. Tomkins, P. Appleby, H. Sewell, G.S. Stewart, B.W. Bycroft, D.I. Pritchard. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. Infect. Immun. 66:36-42.

Ulmasov T., J. Murfett, G. Hagen, T.J. Guilfoyle. 1997. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. Plant Cell 9:1963-1971.

von Rad U., I. Klein, P.I. Drobev, J. Kottova, E. Zazimalova, A. Fekete, A. Hartmann, P. Schmitt-Kopplin, J. Durner. 2008. Response of *Arabidopsis thaliana* to *N*-hexanoyl-DL-homoserine-lactone, a bacterial quorum sensing molecule produced in the rhizosphere. Planta 229:73-85.

Walker T.S., H.P. Bais, E. Déziel, H.P. Schweizer, L.G. Rahme, R. Fall, J.M. Vivanco. 2004. *Pseudomonas aeruginosa*-plant root interactions. Pathogenicity, biofilm formation, and root exudation. Plant Physiol. 134:320-331.

Williams D.E., K. Bombuwala, E. Lobkovsky, D.E. De Silva, V. Karunaratne, T.M. Allen, J. Clardy, R.J. Andersen. 1998. Ambewelamides A and B, antineoplastic epidithiopiperazinediones isolated from the lichen *Usnea* sp. Tetrahedron Lett. 39:9579-9582.

Woodward A.W., B. Bartel. 2005. Auxin: Regulation, action, and interaction. Annals Bot. (Lond) 95:707-735.

Zhang H., A. Jennings, P.W. Barlow, B.G. Forde. 1999. Dual pathways for regulation of root branching by nitrate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:6529- 6534.