

R **espuestas de las rizobacterias a las especies reactivas de oxígeno**

Ernesto García-Pineda y Elda Castro-Mercado

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, UMSNH.

Resumen

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant-Growth Promoting Rhizobacteria, en lo sucesivo PGPR, por sus siglas en inglés) son un grupo de bacterias de vida libre asociadas a la rizósfera, contribuyendo a incrementar el crecimiento y la productividad de un gran número de plantas. Sin embargo, como resultado de las interacciones entre plantas y microorganismos, generalmente se ha observado generación de una explosión oxidativa que deriva en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Los productos de esta respuesta oxidativa pueden tener efectos tóxicos sobre los microorganismos, incluyendo a las rizobacterias. Evidencias recientes indican que, además de las enzimas antioxidativas, cambios en el metabolismo de las bacterias pueden estar involucrados en la respuesta antioxidativa a la producción de ERO por la planta hospedera, sin embargo, esto no se ha explorado en las rizobacterias. Actualmente existe escaso conocimiento sobre los mecanismos a través de los cuales las rizobacterias enfrentan las ERO producidas por las plantas, durante las primeras etapas de la interacción. En esta revisión se analiza parte de la información disponible sobre las respuestas al estrés oxidativo observadas en bacterias y la posibilidad de que una de estas respuestas, la reprogramación metabólica estimulada por este estrés, se presente en las rizobacterias.

Palabras clave: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal, especies reactivas de oxígeno, rizósfera, interacción planta-microorganismo.

Abstract

Antioxidative mechanisms in plant growth promoting rhizobacteria. Plant-Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) are a group of free-living bacteria that colonize the rhizosphere. These contribute to increased growth and yield of crop plants. However, the interaction between plants and microorganisms leads to an oxidative burst by the plants. The products of this oxidative response may have toxic effects on pathogens as well as on beneficial rhizobacteria. In addition to anti-oxidative enzymes, changes in metabolism may be involved in anti-oxidative defense, although this has not been explored in rhizobacteria. Metabolic reprogramming plays a determinant role in the survival of organisms exposed to oxidative stress. At present, how rhizobacteria cope with reactive oxygen species produced by plants during the first stages of colonization is poorly understood. In this review, the information available regarding to oxidative stress responses in bacteria and the possibility of rhizobacteria present a metabolic reprogramming stimulated by this stress is analyzed.

Keywords: Plant-growth promoting rhizobacteria, reactive oxygen species, rhizosphere, plant-microbe interaction.

La rizósfera y las PGPR

La rizósfera es la porción de suelo que rodea a las raíces de las plantas en la cual existen relaciones complejas entre ésta y los microorganismos del suelo. Las propiedades biológicas, físicas y químicas de la rizósfera son factores importantes que determinan su diversidad microbiana, tanto genética como funcional (Brimecombe et al., 2001). Así, la ecología de la rizósfera incluye componentes con el potencial para influenciar significativamente el crecimiento y la productividad de las plantas. Los microorganismos benéficos incluyen a las rizobacterias simbióticas, algunos actinomicetos y hongos micorrícicos, y bacterias de vida libre, los cuales incrementan la disponibilidad de nutrientes o de metabolitos necesarios para el crecimiento de la planta, suprimen potenciales patógenos o ambas cosas (Perseillo-Cartieaux et al., 2003).

Las PGPR son un grupo de bacterias de vida libre que colonizan la rizósfera, potenciando el crecimiento y la productividad de las plantas. Se han identificado diversos géneros de rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal, entre los cuales destacan los géneros de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. (Podile y Kishore, 2006). Los mecanismos descritos involucrados en la regulación del crecimiento vegetal incluyen la producción de reguladores de crecimiento, tales como las auxinas, el etileno, las giberelinas y las citocininas, por parte de estas bacterias (van Loon, 2007).

Sin embargo, la mayoría de las interacciones entre plantas y microorganismos conducen en la planta, a la activación de una explosión oxidativa. Los productos de esta respuesta oxidativa pueden tener efectos tóxicos sobre los diversos microorganismos rizosféricos, patógenos o no patógenos, incluyendo a las rizobacterias.

La explosión oxidativa es una respuesta ubicua en plantas en contra del ataque por patógenos y su activación parece ser una consecuencia primaria del daño producido durante el curso de una infección. Sin embargo, mientras que una sobre acumulación incrementa la susceptibilidad de las plantas por causar la muerte celular, una producción controlada permite su uso para la activación de respuestas de defensa que contribuyen a la inmunidad de las plantas (Vellosillo et al., 2010).

Especies reactivas de oxígeno y las PGPR

La explosión oxidativa es la producción de ERO, utilizando oxígeno molecular, durante la interacción planta-microorganismo, la cual constituye una de las primeras respuestas locales activadas por las plantas. Las principales ERO son el singulete de oxígeno ($^1\text{O}_2$), el radical hidropéroxido (HO_2), el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el radical hidroxilo (HO). Estas moléculas son altamente reactivas y por lo tanto muy tóxicas para la célula, participando en procesos importantes de defensa en contra de la colonización por diversos microorganismos (Apel y Hirt 2004).

La producción de ERO, y especialmente la de H_2O_2 , se ha reportado en interacciones de plantas con una gran variedad de microorganismos patógenos y no patógenos (Unger et al., 2005). Estas moléculas se pueden interconvertir, así por ejemplo, el O_2^- es convertido en H_2O_2 por la enzima superóxido dismutasa (SOD), y el H_2O_2 puede producir HO a través de la reacción de Fenton, la cual es catalizada por iones libres de metales de transición.

Las ERO tienen propiedades muy diferentes. El H_2O_2 es relativamente estable y su concentración en los tejidos vegetales se encuentra en el rango micromolar (Halliwell y Gutteridge, 1999; Cheeseman, 2006). Las otras moléculas son muy inestables, tienen vidas medias muy cortas y se encuentran en concentraciones por debajo del rango micromolar en las células. También presentan diferentes reactividades químicas, por ejemplo, el HO reacciona rápidamente con todos los componentes de la célula, y el O_2^- reacciona primeramente con proteínas que tienen centros Fe-S (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Las ERO se pueden producir en las células vegetales, por la actividad de la enzima NADPH-oxidasa, la cual se encuentra asociada a la membrana plasmática, por peroxidases unidas a la pared celular, y por amino oxidasas localizadas en el apoplasto (Grant y Loake, 2000; Hammond-Kosack y Jones, 2000). A diferencia del O_2^- , el H_2O_2 se puede difundir hacia el interior de las células y activar respuestas de defensa, incluyendo la muerte celular programada (Dangl y Jones, 2001).

Estas y otras respuestas de defensa se activan durante la interacción de rizobacterias con plantas, algunas de estas respuestas se han caracterizado en dicotiledóneas. Así, en raíces de pepino colonizadas por *Pseudomonas* sp se han observado altas actividades de las enzimas fenilalanina amonio liasa, peroxidasa y polifenol oxidasa (Chen et al., 2000), y en plántulas de chícharo se produce H_2O_2 en respuesta al tratamiento con un consorcio microbiano formado por *Pseudomonas aeruginosa* PJHU15, *Trichoderma harzianum*

TNHU27 y *Bacillus subtilis* BHHU100 (Jain et al., 2012). También se ha observado la alteración en la expresión génica en las plantas. En raíces de trigo, 11 genes relacionados a estrés y defensa se inducen dentro de las primeras 6 horas de interacción con *Pseudomonas fluorescens* Q8r1-96, los cuales están relacionados con tres rutas generales de defensa: la respuesta hipersensible, el estrés oxidativo y la señalización por ácido jasmónico (Okubara et al., 2010).

Actualmente la información sobre como las rizobacterias enfrentan la producción de ERO producidas por la planta durante los primeros estados de la colonización de la raíz es escasa y se requieren más estudios para tener un mejor entendimiento sobre este proceso. Si bien el tema ha sido poco estudiado en las rizobacterias, existen estudios en otras bacterias sobre los mecanismos que utilizan para lidiar con un ambiente oxidativo. En este sentido, se ha observado que en condiciones normales las bacterias se confrontan con la producción de especies reactivas de oxígeno, primero, durante la generación de energía para diversos procesos celulares, en donde puede ocurrir la reducción univalente secuencial del oxígeno para producir O_2^- , H_2O_2 , y/o HO (Fridovich, 1978). Alternativamente, las bacterias pueden estar sujetas a condiciones micro-ambientales en donde se pueden generar radicales de oxígeno de forma exógena. El ejemplo más importante es el ataque de bacterias patógenas por células fagocíticas. En cualquier caso, la sobrevivencia de la bacteria depende de la presencia de una serie de defensas, las cuales incluyen enzimas destoxificantes, moléculas antioxidantes, y sistemas de reparación de proteínas y del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Hassan y Fridovich 1977). Una enzima clave en contra del O_2^- es la enzima SOD. Casi todas las bacterias que usan el oxígeno como un aceptor de electrones terminal producen una o más SOD. *Escherichia coli*, por ejemplo, produce SODs con cofactores de Mn (codificada por el gen *sodA*) y/o con cofactores de Fe (codificada por el gen *sodB*), o enzimas híbridas que contienen ambos cofactores, localizadas en el citoplasma (Britton y Fridovich, 1977). Esta enzima también se ha estudiado en cultivos de *Azospirillum brasilense* Sp7, una PGPR, adicionados con amonio, observando una sola banda de actividad para SOD mediante una electroforesis en geles de poliacrilamida (Richard y Knowles, 1983); sin embargo, se desconoce si esta enzima participa en la destoxificación de las ERO producidas por las plantas durante la colonización de la raíz.

Adicionalmente, se ha observado que la reprogramación metabólica juega un papel importante en la sobrevivencia de bacterias expuestas a estrés oxidativo. Por ejemplo, se ha observado que *P. fluorescens*, como parte de la estrategia para combatir el estrés oxidativo, disminuye la formación de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) para limitar la producción de ERO por la cadena respiratoria. La oxidación de NADH por los complejos respiratorios es el principal generador intracelular de ERO (Fig. 1). Además, se incrementa la producción de NADPH, el cual neutraliza las ERO y mantiene el sistema antioxidativo en un estado activo. Por lo tanto, la manipulación de rutas metabólicas y de diferentes enzimas involucradas en el metabolismo de nucleótidos de piridina es muy importante para asegurar que los niveles de ERO permanezcan en niveles no tóxicos (Finkel y Holbrook, 2000; Singh et al., 2008), de esta forma un organismo estresado oxidativamente se beneficiará de man-

tener bajos los niveles de los sistemas NADH/NAD y altos los niveles de los sistemas NADPH/NADP (Aon et al., 2010). Así, *P. fluorescens* expuesta a altas cantidades de metales que producen ERO manipula estas relaciones para disminuir el estrés oxidativo y limitar la producción de estos oxidantes (Chenier et al., 2008; Lemire et al., 2010).

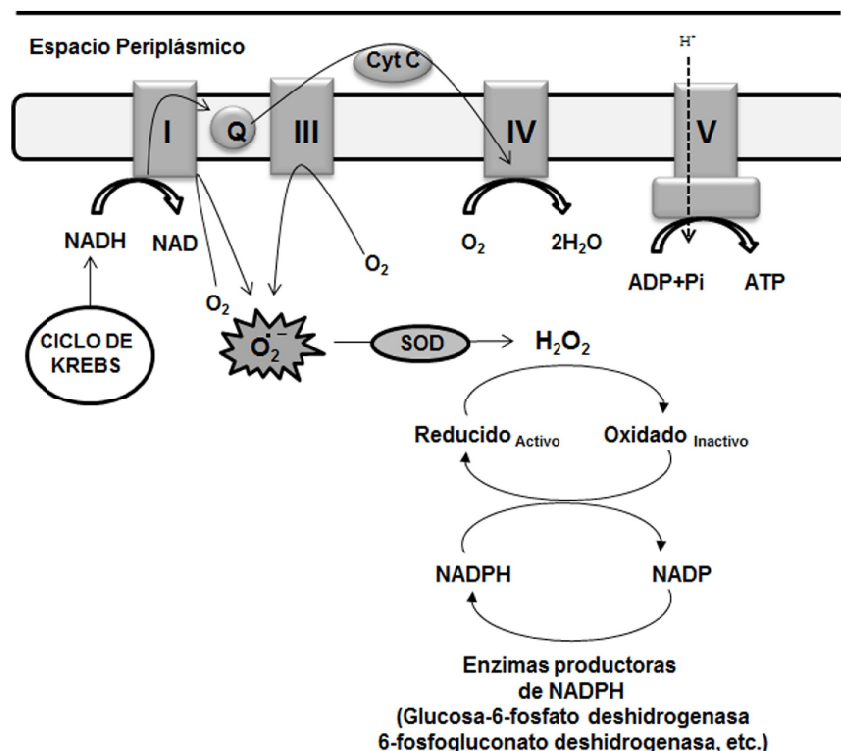


Figura 1. El NADH es la base del metabolismo antioxidativo. La cadena respiratoria es la fuente principal de ERO en una célula aeróbica. El NADH que se genera en el Ciclo de Krebs es oxidado por el Complejo I. Los electrones liberados son transferidos a través de una serie de complejos hasta el aceptor final que es el oxígeno. Las ERO se generan como subproductos durante este proceso y estas se inactivan por las defensas antioxidantes. La superóxido dismutasa (SOD) convierte el anión superóxido en peróxido de hidrógeno el cual es neutralizado por enzimas y metabolitos antioxidantes. Después de la inactivación oxidativa, los buscadores de ERO son reactivados por el poder reductor almacenado en el NADPH. EL NADPH posteriormente se regenera por enzimas que producen NADPH. Tomado de Mailloux et al. (2011).

El futuro de la investigación de las PGPR y el estrés oxidativo

La probabilidad de que las bacterias benéficas encuentren en la rizósfera compuestos tóxicos, tales como ERO, u otros compuestos antimicrobianos como las fitoalexinas es alta, lo cual propiciará una selección de microorganismos que posean mecanismos de des-

toxificación, o que eviten la toxicidad de ese ambiente. Ante estas circunstancias, algunos microorganismos asociados a la raíz han desarrollado mecanismos de resistencia inducibles basados en cambios en la permeabilidad de la membrana externa o la exclusión activa de compuestos (Palumbo et al., 1998; González-Pasayo y Martínez-Romero, 2000; Burse et al., 2004). *Rhizobium etli*, por ejemplo, posee una bomba de eflujo para compuestos tóxicos que es inducible por flavonoides, y que confiere una resistencia incrementada a las fitoalexinas pterocarpanos, como la faseolina (González-Pasayo y Martínez-Romero, 2000). Desde esta perspectiva debería de ser ventajoso competitivamente para las PGPR poseer mecanismos que actúen en contra de compuestos potencialmente tóxicos secretados por las plantas.

Actualmente no es claro el papel de las ERO producidas por las plantas durante la colonización de la raíz por las PGPR y tampoco se conoce si la interacción provoca una reprogramación metabólica en estas bacterias, tal como la descrita para otros tipos de bacterias cuando enfrentan un estrés oxidativo. Si bien se considera que los cambios en el metabolismo descritos anteriormente reducen el daño oxidativo por la producción interna de ERO, estos experimentos se realizaron adicionando exógenamente H_2O_2 a los cultivos bacterianos, lo que permite inferir que estos cambios también se pueden estimular por la exposición externa a una fuente de ERO, como es el caso durante la interacción de las plantas con los microorganismos. Las ERO son compuestos tóxicos para todos los organismos aeróbicos, lo cual enfatiza la necesidad de profundizar en el estudio de los mecanismos antioxidativos en rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por la Coordinación de la Investigación Científica, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.

Referencias

- Aon M.A., Cortassa S. y B. O'Rourke. 2010. Redox-optimized ROS balance: a unifying hypothesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1797: 865-877.
- Apel, K., y H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Brimecombe, M.J., De Lelj, F.A. y J.M. Lynch. 2001. The Rhizosphere: the effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: *The Rhizosphere Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*, pp.95-140. Edited by R. Pinton, Z. Varanini, and P. Nannipieri. New York: Marcel Dekker.
- Britton, L. e I. Fridovich. 1977. Intracellular localization of the superoxide dismutases of *Escherichia coli*: a reevaluation. *J. Bacteriol.* 131: 815-820.

- Burse, A., Weingart, H. y M.S. Ullrich. 2004. NorM, an *Erwinia amylovora* multidrug efflux pump involved in *in vitro* competition with other epiphytic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70: 693-703.
- Cheeseman, J.M. 2006. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions. J. Exp. Bot. 57: 2435-44.
- Chen, C., Belanger, R.R., Benhmou, N. y T.C. Paulitz. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Phythium aphanidermatum*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 56:13-23.
- Chenier, D., Beriault, R., Mailloux, R., Baquie, M., Abramia, G., Lemire, J. y V. Appanna. 2008. Involvement of fumarase C and NADH oxidase in metabolic adaptation of *Pseudomonas fluorescens* cells evoked by aluminum and gallium toxicity. Appl. Environ. Microbiol. 74: 3977-3984.
- Dangl, J.L. y J.D.G. Jones. 2001. Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Nature 411: 826-833.
- Finkel, T. y N.J. Holbrook. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature 408: 239-247.
- Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. Science (Washington, DC) 201: 875-880.
- González-Pasayo, R. y E. Martínez-Romero. 2000. Multiresistance genes of *Rhizobium etli* CFN42. Mol. Plant Microbe Interact. 13: 572-577.
- Grant, J.J. y G.J. Loake. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. Plant Physiol. 124: 21-29.
- Halliwell, B. y J.M.C. Gutteridge. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd edn, Oxford: Oxford Univ. Press.
- Hammond-Kosack, K. y J.D.G. Jones. 2000. Responses to plant pathogens. In: Biochemistry and Molecular Biology of Plants, pp. 1102-1156. Edited by B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones. Rockville, MD: Am. Soc. Plant Physiol.
- Hassan, H. M. y I. Fridovich. 1977. Enzymatic defenses against the toxicity of oxygen and of streptonigrin in *Escherichia coli*. J Bacteriol 129: 1574-1583.
- Jain, A., Singh, A., Singh, S. y H.B. Singh. 2012. Microbial consortium-induced changes in oxidative stress markers in pea plants challenged with *Sclerotinia sclerotiorum*. J Plant Growth Regul. DOI 10.1007/s00344-012-9307-3
- Lemire, J., Mailloux, R., Auger, C., Whalen, D. y V.D. Appanna. 2010. *Pseudomonas fluorescens* orchestrates a fine metabolic-balancing act to counter aluminium toxicity. Environ. Microbiol. 12: 1384-1390.
- Mailloux, R.J., Joseph Lemire, J. y V.D. Appanna. 2011. Metabolic networks to combat oxidative stress in *Pseudomonas fluorescens*. Antonie van Leeuwenhoek 99: 433-442.

- Okubara, P.A., Call, D.R., Kwaka, Y. y D.Z. Skinner. 2010. Induction of defense gene homologues in wheat roots during interactions with *Pseudomonas fluorescens*. Biol. Control 55: 118–125.
- Palumbo, J.D., Kado, C.I. y D.A. Phillips. 1998. An isoflavonoid inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. J. Bacteriol. 180: 3107-3113.
- Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. y C. Robaglia. 2003. Tales from the underground, molecular plant-rhizobacteria interactions. Plant Cell Environ. 26: 189–199.
- Podile, A.R. y G.K. Kishore. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria In Plant-Associated Bacteria, pp. 195-230. Edited by S.S. Gnanamanickam. Netherlands: Springer.
- Richard, W.C. y R. Knowles. 1983. Superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in ammonium-grown and nitrogen-fixing *Azospirillum brasilense*. Can. J. Microbiol. 30: 1222-1228.
- Singh, R., Lemire, J., Mailloux, R.J. y V.D. Appanna. 2008. A novel strategy involved in anti-oxidative defense: the conversion of NADH into NADPH by a metabolic network. PLoS One 3: e2682.
- Unger, C., Kleta, S., Jandl, G. y A. Van Tiedemann. 2005. Suppression of the defence-related oxidative burst in bean leaf tissue and bean suspension cells by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. J. Phytopathol. 153: 15–26.
- van Loon, L. C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. Eur. J. Plant Pathol. 119:243–254.
- Vellosillo, T., Jorge Vicente, J., Kulasekaran, S., Hamberg, M., Castresana, C. 2010. Emerging complexity in reactive oxygen species production and signaling during the response of plants to pathogens. Plant Physiol. 154:444–448.