

Sistema de secreción **tipo III** en la interacción de *Pseudomonas syringae* con la planta

Carmen R. Beuzón y Javier Ruiz-Albert

Instituto de Hortofruticultura Subtropical y Mediterránea «La Mayora» – Universidad de Málaga – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IHSM-UMA-CSIC), Depto. Biología Celular, Genética y Fisiología, Campus de Teatinos, Málaga

cbl@uma.es



Foto de grupo. De izquierda a derecha, Juan José González-Plaza, Diego López-Márquez, Alberto Macho, Inmaculada Ortiz-Martín, Carmen Beuzón, Javier Ruiz-Albert, Jose Rufian y Adela Zumaquero.

P*seudomonas syringae* es una bacteria Gram-negativa, patógena de plantas, que se clasifica en patovares según su especificidad de hospedador. Este patógeno es capaz de persistir sobre semillas secas y restos vegetales, activándose durante el proceso de germinación. Puede también sobrevivir epifíticamente, en la superficie de las hojas, o penetrar en ellas a través de aperturas naturales como estomas o heridas, y crecer activamente en el apoplasto de

la misma, causando en este caso enfermedad. *P. syringae* se transmite por contacto directo entre plantas y a través del agua de lluvia o riego. La infección por este patógeno determina pérdidas económicas importantes pudiendo afectar gravemente tanto la producción neta como la calidad del producto obtenido. Las estrategias de prevención habituales, a menudo insuficientes, poco eficientes y/o contaminantes, consisten en el uso de tratamientos químicos con base de

cobre, el uso de material vegetal libre de patógeno, la rotación de cultivos, y en el cultivo de variedades tradicionalmente más resistentes. El desarrollo de nuevas estrategias de control de las enfermedades causadas por este patógeno es por tanto necesario y de gran interés económico, y requiere de un mayor conocimiento tanto de los mecanismos de virulencia del patógeno como de los mecanismos de defensa contra el mismo, que distintas especies vegetales hayan podido desarrollar. Nuestro equipo lleva más de 10 años dedicado al análisis de la interacción entre *P. syringae* y la planta, siguiendo diversas aproximaciones experimentales, dirigidas por Carmen R. Beuzón y/o Javier Ruiz-Albert, y habiendo establecido numerosas colaboraciones dentro y fuera del país.

El éxito de *P. syringae* en la colonización y desarrollo de la enfermedad en un determinado hospedador requiere la evasión y/o supresión de las defensas presentadas por la planta infectada. *P. syringae* logra suprimir la respuesta de defensa de su hospedador mediante un conjunto de proteínas conocidas como efectores, que la bacteria introduce en el citosol de la célula hospedadora a través de un sistema de secreción de tipo III (type III secretion system o T3SS). Los T3SS son sistemas complejos cuya estructura básica está muy conservada entre patógenos de animales y de plantas. La expresión de los genes que codifican componentes del T3SS, o sus efectores, se activa tras la entrada de la bacteria en el apoplasto, y está sujeta a una compleja regulación que combina reguladores negativos y positivos. Nuestro laboratorio ha caracterizado dicha regulación en la estirpe de referencia, *P. syringae* pv. *phaseolicola* 1448a (en adelante *Pph* 1448a), un relevante patógeno de judía (Ortiz-Martín *et al.*, 2006; Ortiz-Martín *et al.*, 2010a; Ortiz-Martín *et al.*, 2010b). En la actualidad tenemos dos líneas de trabajo abiertas en aspectos relacionados: una dedicada al análisis de la regulación del proceso de secreción y su jerarquía, y otra a la variabilidad de su expresión en la planta mediante el uso de fusiones transcripcionales a marcadores fluorescentes y métodos de análisis de células individuales (microscopía confocal y citometría de flujo).

Las estirpes de *P. syringae* codifican entre 15 y 35 efectores, según estirpe y patovar. Nuestro laboratorio ha desarrollado herramientas moleculares con las que hemos contribuido a completar el inventario de efectores de *Pph* 1448a (Macho *et al.*, 2009; Zumaquero *et al.*, 2010), y hemos generado mutantes para la mayoría de ellos, tanto en *Pph* 1448a como en una segunda estirpe de referencia, *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (en adelante *Pto* DC3000), un relevante patógeno de tomate. La estirpe *Pto* DC3000 es capaz de causar enfermedad en la planta *Arabidopsis thaliana*, en lo que constituye el modelo más empleado para el estudio de la interacción planta-bacteria a nivel molecular. Nuestro laboratorio ha adaptado para el análisis de *P. syringae* y otras bacterias fitopatógenas (Macho *et al.*, 2007; Macho *et al.*, 2010a) los análisis de virulencia mediante índices de competitividad empleados en patógenos animales (Beuzón y Holden, 2001), lo que nos ha permitido analizar la contribución a la virulencia de todos los mutantes en efectores generados en *Pph* 1448a (Macho *et al.*, 2012).

Trabajos recientes de diferentes laboratorios, destinados a la caracterización funcional de efectores en diferentes patovares de *P. syringae*, han mostrado que muchos de ellos son capaces de suprimir defensas cuando son sobreexpresados en sistemas heterólogos o directamente en la planta.

Las plantas responden al ataque de *P. syringae* siguiendo dos líneas de defensa, según el tipo de moléculas del patógeno que sean detectadas. La planta detecta inicialmente moléculas muy conservadas, denominadas genéricamente PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), cuyo ejemplo más caracterizado es la flagelina. Este reconocimiento está mediado por receptores localizados en la membrana plasmática de la célula vegetal y denominados genéricamente PRRs (Pattern-Recognition Receptors), que disparan una respuesta de defensa conocida como PTI (PAMP-Triggered Immunity), habitualmente de baja intensidad. Un microorganismo invasor también puede ser reconocido a través de sus efectores. Este tipo de reconocimiento es indirecto, siendo su base la detección de las modificaciones que el efector lleva a cabo sobre sus dianas en la planta, y lo realizan receptores intracelulares del tipo NB-LRR (Nucleotide-Binding, Leucine-Rich Repeat-containing proteins), conocidos como proteínas de resistencia (proteínas R). Esto da lugar a una respuesta de elevada intensidad denominada ETI (Effector-Triggered Immunity) asociada habitualmente al disparo de un proceso de muerte celular programada, conocida como respuesta de hipersensibilidad (Hypersensitive Response o HR).

La activación de la respuesta PTI es lenta, lo cual resulta adecuado en una respuesta de inmunidad que no discrimina entre bacterias patógenas y no patógenas, pero su intensidad se va incrementando con el tiempo. Esta lenta cinética inicial permite a los patógenos adaptados suprimirla mediante la translocación de efectores en la célula hospedadora al inicio de la infección, que previenen la amplificación de la señal hasta niveles suficientes para proteger a la planta frente al patógeno. En contraste con las PAMPs, los efectores son moléculas características de patógenos, cuyo reconocimiento provoca una respuesta de defensa rápida e intensa. La respuesta ETI es más eficaz frente a patógenos adaptados ya que por su mayor rapidez e intensidad, es más difícil de suprimir por el patógeno (Katagiri and Tsuda, 2010). Este tipo de defensa suele además estar asociado al disparo de inmunidad sistémica (Systemic Acquired Resistance o SAR) (Cameron *et al.*, 1994), que protege a regiones distales de la planta frente a nuevas infecciones. Pero los patógenos también parecen haber adquirido la capacidad de suprimir ETI a través de efectores. Nuestro laboratorio ha descrito uno de los ejemplos de dicha capacidad, el efector HopZ1a de *P. syringae* pv. *syringae*, miembro de la familia de efectores caracterizada por el efector de *Yersinia pestis* YopJ. HopZ1a es capaz de suprimir la ETI disparada frente a diferentes efectores, dependientes de diferentes proteínas R, e inducidas a través de todas las diferentes cascadas de señalización conocidas hasta la fecha, incluyendo a las disparadas por el patógeno *Pto* DC3000 durante el desarrollo de la enfermedad (Macho *et al.*, 2010b; Macho

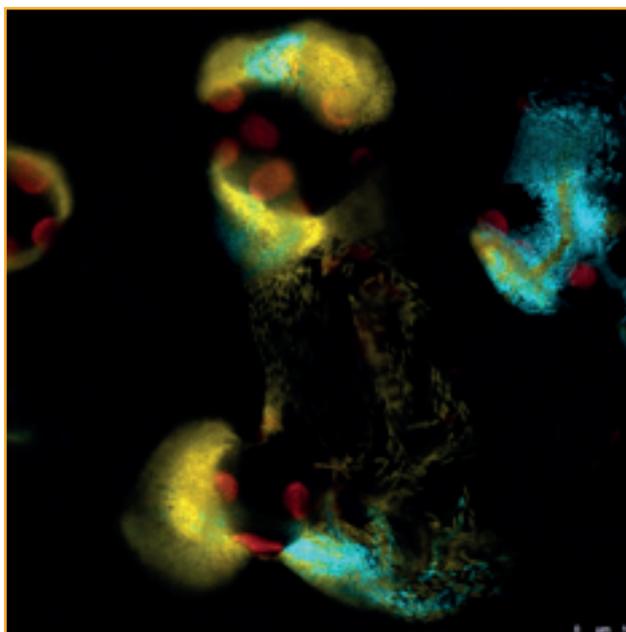


Figura 1. Imagen de microscopía confocal de una hoja de judía 4 días después de su inoculación con una mezcla (1:1) de 5×10^5 cfu/ml de *Pseudomonas syringae* patovar *phaseolicola* 1448a expresando eYFP (amarillo) o eCFP (azul). En rojo se aprecia la autofluorescencia de los cloroplastos de las células vegetales cercanas a la microcolonia, donde se pueden observar en algunas zonas bacterias individuales.

y Beuzón, 2010). HopZ1a es también capaz de suprimir la inmunidad sistémica conocida como SAR. Esto indica un mecanismo de acción generalista e implica su acción sobre un elemento común a todas estas defensas, aún por identificar, y en cuya identificación trabajamos en la actualidad.

Hasta la fecha, la caracterización de actividad supresora de un determinado efector siempre ha sido ensayada frente a la respuesta de defensa tipo ETI disparada por efectores heterólogos bien conocidos, pero que no son expresados de manera natural por el patógeno que expresa el supresor (Rosebrock *et al*, 2007; Ntoukakis *et al*, 2009; Wilton *et al*, 2010). Un elevado número de efectores presentan actividad de supresión de ETI, lo que sugiere que la supresión de este tipo de defensas podría tener un papel determinante en el proceso de adaptación del patógeno a su hospedador. En este sentido, la supresión total o parcial del disparo de ETI

podría representar una estrategia alternativa de adaptación al hospedador, frente a estrategias evolutivas generalmente aceptadas como la pérdida del efector que es detectado por la planta, o su evolución por mutación (patoadaptación). Otra de las líneas de investigación de nuestro laboratorio se centra en la caracterización del impacto que la supresión cruzada de defensas tiene en la adaptación de un patógeno a su hospedador. Dentro de esta línea, hemos generado bacterias marcadas con diferentes fluoróforos que nos permiten el seguimiento del proceso de colonización y proliferación en poblaciones simples y mixtas.

BIBLIOGRAFÍA

- Macho AP, Zumaquero A, Ortiz-Martín I, Beuzón CR.** (2007). Competitive Index: a sensitive and accurate method to quantify growth of *Pseudomonas syringae* in different hosts. *Mol Plant Pathol* 8:437-450.
- Macho AP, Ruiz-Albert J, Tornero P, Beuzón CR.** (2009). Identification of new type III effectors and analysis of the plant response by competitive index. *Mol Plant Pathol* 10:69-80.
- Macho AP y Beuzón CR.** (2010). Insights into plant immunity signaling: The bacterial competitive index angle. *Plant Signal Behav* 5: 1590-1593.
- Macho AP, Guidot A, Barberis P, Beuzón CR y Genin S.** (2010a). A competitive index assay identifies several *Ralstonia solanacearum* type III effector mutant strains with reduced fitness in host plants. *Mol Plant Microb Interact* 23:1197-1205.
- Macho AP, Guevara CM, Tornero P, Ruiz-Albert J, Beuzón CR.** (2010b). The *Pseudomonas syringae* effector proteína HopZ1a suppresses effector-triggered immunity. *New Phytol* 187:1018-1033.
- Macho AP, Zumaquero A, González-Plaza JJ, Ortiz-Martín I, Rufián JS, Beuzón CR.** (2012). Genetic Analysis of the Individual Contribution to Virulence of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *PLoS One* 7:e35871.
- Ortiz-Martín I, Macho AP, Lambersten L, Ramos C, Beuzón CR.** (2006). Suicide vectors for antibiotic marker exchange and rapid generation of multiple knockout mutants by allelic exchange in Gram-negative bacteria. *J Microbiol Meth* 67:395-407.
- Ortiz-Martín I, Thwaites R, Macho AP, Mansfield JW, Beuzón CR.** (2010a). Positive Regulation of the Hrp Type III Secretion System in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 23:665-681.
- Ortiz-Martín I, Thwaites R, Mansfield JW, Beuzón CR.** (2010b). Negative Regulation of the Hrp Type III Secretion System in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant Microbe Interact* 23:682-701.
- Zumaquero A, Macho AP, Rufián JS, Beuzón CR.** (2010). Analysis of the role of the type III secretion inventory in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448a in the interaction with the plant. *J Bacteriol* 192:4474-4488.