



Caracterización del sistema de regulación por densidad poblacional ("quorum sensing") en *Rhizobium leguminosarum* UPM791

Sánchez-Cañizares, C.¹, Cantero, L.¹, Morata, A.², Ruiz Argüeso, T.¹, Imperial Ródenas, J.³ y Palacios Alberti, J.M.¹

¹Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas - UPM - INIA. Universidad Politécnica de Madrid. Campus de Montegancedo. Carretera M40-km 37,7. Pozuelo de Alarcón. 28223 Madrid

²Departamento de Tecnología de Alimentos. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 28040 Madrid

³Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid

Las bacterias son capaces de percibir cambios en la densidad de población y responder a ellos de manera coordinada activando rutas de respuesta en diversos procesos biológicos gracias a un sistema de comunicación intercelular conocido como *quorum sensing* (QS). En el caso de la bacteria Gram negativa *Rhizobium leguminosarum* UPM791 (RI UPM791), se han descrito dos sistemas funcionales de regulación por QS mediados por señales de tipo Acil Homoserin Lactonas (AHLs): el sistema *cinRI*, localizado en el cromosoma, y el sistema *rhiRI*, en el plásmido simbiótico. Ambos sistemas son homólogos al sistema modelo de dos componentes *luxRI* de la bacteria marina *V. fischeri*. En este trabajo se han caracterizado las AHLs sintetizadas por RI UPM791 mediante un análisis estructural llevado a cabo con HPLC y espectrometría de masas. En función de los patrones de fragmentación y los iones moleculares característicos, se han identificado en el sobrenadante de cultivos de esta cepa, las siguientes moléculas: C₆-HSL, C₇-HSL y C₈-HSL, sintetizadas por el sistema *rhiRI*, y 3-OH-C₁₄-HSL, sintetizada por el sistema cromosómico *cinRI*. Asimismo, se ha podido detectar la presencia de C₄-HSL en pequeñas cantidades.

Por otro lado, se ha estudiado el papel de los sistemas de regulación por QS en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. Para ello, se han realizado ensayos de competitividad por la nodulación de la raíz de guisante por cepas de RI UPM791 y 3841 productoras de AHLs, y cepas derivadas de las mismas, pero desprovistas de AHLs. Estas últimas se obtuvieron mediante la introducción del gen *aiiA*, que expresa constitutivamente una enzima lactonasa capaz de degradar las señales de tipo AHL producidas por la bacteria. Los resultados sugieren que la inactivación de los sistemas de comunicación de la bacteria afecta significativamente la competitividad de RI UPM791 frente a la otra cepa.

Además del plásmido simbiótico, otro de los cuatro plásmidos nativos que presenta RI UPM791 (pUPM791d) interviene también en la regulación de los sistemas de QS. Cuando dicho plásmido no está presente, desaparece la señal 3-OH-C₁₄-HSL, lo que indica la existencia de un tipo de regulación dependiente de dicho plásmido sobre el sistema cromosómico *cinRI*. Esta molécula señal está descrita como bacteriocina, ya que inhibe el crecimiento de cepas sensibles a ella. Con el fin de estudiar esta compleja regulación, se han construido distintas fusiones génicas a los sistemas *cin* y *rhi*. Estas fusiones se han analizado en fondos genéticos que difieren en el contenido plasmídico de la bacteria. En estos análisis se ha demostrado que la sintasa *cinI* presenta su propio promotor, localizado aguas abajo del regulador *cinR*. Además, se ha observado que la expresión de *cinI* es inducida significativamente en ausencia del plásmido pUPM791d, lo que sugiere la existencia de una regulación a nivel postranscripcional ejercida a través de un determinante génico localizado en el plásmido pUPM791d.