

## Hidrogenasas de las bacterias que nodulan leguminosas

(adaptado y traducido de Ruiz-Argueso, T., J. Imperial & J.M. Palacios (2000). Prokaryotic Nitrogen Fixation. E.W. Triplett, ed. Wymondham, U.K.: Horizon Scientific Press, pp. 489-507)

Las hidrogenasas de captación de hidrógeno catalizan la oxidación del hidrógeno molecular a protones, y están presentes en un gran número de bacterias aeróbicas, en las que los electrones procedentes de la oxidación del hidrógeno se transportan por la cadena respiratoria hasta el oxígeno, que actúa como aceptor final, pudiéndose obtener energía por fosforilación oxidativa. Las bacterias del hidrógeno (“knallgas”), en las que el hidrógeno se utiliza como única fuente de energía para el crecimiento (1,2), representan un caso extremo de este potencial. Las hidrogenasas de este tipo pueden tener importancia en los organismos fijadores de nitrógeno a causa de la reducción concomitante e inevitable de protones a hidrógeno que cataliza la nitrogenasa. Este hidrógeno así generado puede ser reciclado por la hidrogenasa de captación del propio organismo aumentando, por tanto, la eficiencia energética de la fijación de nitrógeno (3,4). El reciclaje de hidrógeno es especialmente relevante para las simbiosis diazotróficas entre leguminosas y bacterias que las nodulan, dado que puede incrementar la eficiencia energética de la simbiosis y, en último extremo, la productividad vegetal. Por ello no es sorprendente que este tema haya sido objeto de numerosas revisiones previas (5-10), que recomendamos para aquellos aspectos, como los de la distribución y fisiología de los sistemas hidrogenasa en los *Rhizobium* que, por haber progresado menos en tiempos recientes, no se tratan en profundidad en lo que sigue.

### Hidrogenasas y reciclaje de hidrógeno en los nódulos de leguminosas

La hidrogenasa de captación de los *Rhizobium* es una enzima dimérica ( $\alpha\beta$ ), unida a membrana, y que contiene NiFe. Hasta la fecha únicamente ha sido aislada y caracterizada de *Bradyrhizobium japonicum*, tanto a partir de células en vida libre como a partir de bacteroides de soja (véanse revisiones en 5,7,8). Tanto la estructura primaria (véase más abajo) como las propiedades de las hidrogenasas [NiFe] de membrana, y sus sistemas auxiliares se encuentran muy bien conservados en bacterias muy diversas (11-13). Por esta razón, muchos de los resultados obtenidos con sistemas específicos (como el bien conocido de *Escherichia coli*) han podido ser extrapolados a sistemas menos conocidos. Recientemente se ha determinado la estructura cristalina de la hidrogenasa [NiFe] de *Desulfovibrio gigas* (14-16), y se espera que las principales características estructurales estarán conservadas en el resto de sistemas. Entre ellas destacan: un centro activo bimetálico [NiFe] en la subunidad grande, con ligandos del hierro poco comunes en biología consistentes en CO y CN, y tres agrupaciones sulfoférricas en la subunidad pequeña (14,15).

Los *Rhizobium* que expresan actividad hidrogenasa ( $\text{Hup}^+$ , de Hydrogen uptake) son capaces de reoxidar el hidrógeno generado por la nitrogenasa y producir nódulos radicales que no desprenden hidrógeno, o desprenden muy poco. Dado el potencial de estos sistemas de captación de hidrógeno para mejorar la eficiencia energética de las simbiosis diazotróficas, resulta algo sorprendente que la capacidad de reciclar hidrógeno no esté ampliamente distribuida entre los *Rhizobium* “véase una revisión en 8, y también más abajo). En muchas bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, y *Mesorhizobium*, el fenotipo  $\text{Hup}^+$  es un carácter raro. En algunos casos, los determinantes genéticos del sistema *hup* parecen estar presentes, pero no se han encontrado condiciones adecuadas para que se expresen (véase 10). Pese a que se han efectuado prospecciones repetidas (véase 8), dentro de los *Rhizobium* de crecimiento rápido sólo se han podido detectar actividades hidrogenasa medibles y repetitivas, así como presencia de genes *hup* en los siguientes casos: i) algunas cepas de *R. leguminosarum* bv. viciae; ii) entre las bacterias que nodulan judías, en cepas de *R. tropici* que pertenecen al subgrupo IIb (17,18); y iii) cepas no caracterizadas que nodulan *Astragalus* (19). No se han encontrado cepas que reciclen hidrógeno eficientemente en los rizobios de crecimiento rápido que nodulan plantas tan importantes como la alfalfa y los tréboles (20) o los garbanzos (21). Entre los *Rhizobium* de crecimiento lento (género *Bradyrhizobium*), el fenotipo  $\text{Hup}^+$  no es raro en cepas de lupino y soja, y es muy común en cepas que nodulan caupí. Finalmente, la mayoría de las cepas de *Azorhizobium* son  $\text{Hup}^+$ . Las razones para esta distribución tan poco homogénea no están claras, pero podrían estar relacionadas con: i) posibles papeles específicos del sistema *Hup* en la biología de algunos *Rhizobium* en el suelo (como la quimiolitotrofia de *B. japonicum*, 5, 22); y ii) la presencia de los genes *hup* en plásmidos en muchos *Rhizobium* (véase más abajo). Como resultado, la mayoría de las cepas que se usan como inoculantes de leguminosas son  $\text{Hup}^-$ . Como se discute más adelante, esto abre posibilidades para la explotación biotecnológica de los sistemas *Hup* descritos.

#### Determinantes genéticos de la hidrogenasa

La síntesis de la enzima hidrogenasa requiere la acción concertada de un gran número de proteínas. En *R. leguminosarum* y *B. japonicum* el conjunto de determinantes genéticos implicados en este proceso se agrupa en una región de ADN de más de 15 kb (Fig. 1) que ha sido identificada en el plásmido simbiótico de *R. leguminosarum* (23) y en el cromosoma de *B. japonicum* (24). La mayoría de los genes de oxidación de hidrógeno en *Rhizobium* se denominan genes *hup*, pero un subconjunto específico de entre ellos se denominan genes *hyp*, por su homología con un operón pleiotrópico previamente descrito en *E. coli*. La agrupación *hup* de *R. leguminosarum* incluye 18 genes (*hupSLCDEFGHIJKhypABFCDEX*) estrechamente ligados y que se transcriben en la misma dirección. La agrupación de *B. japonicum* contiene 24 genes (*hupNOPUVSLCDFGHIJKhypABFCDEhoxXA**hupT*, Fig. 1).

Aún no se dispone de un modelo general que explique el papel de cada producto génico en el proceso de síntesis de la hidrogenasa. Entre los productos necesarios para la síntesis de la hidrogenasa se incluyen las subunidades estructurales (HupSL), además de un gran número de otras proteínas, cuyas funciones se resumen en la Tabla 1. Entre las funciones potenciales adscritas a estos productos génicos se encuentran el transporte de electrones (HupC), procesamiento proteolítico de subunidades (HupD), andamiaje (HupK), modificaciones redox (HupI), y procesamiento de níquel (productos de la agrupación *hyp*). Algunas de estas funciones fueron descritas primeramente en otras bacterias, principalmente en *E. coli*, y han sido generalizadas basándose en la gran conservación de los sistemas hidrogenasa en diferentes bacterias (véase 11-13). En la agrupación de *B. japonicum* se encuentran genes implicados en la regulación de la expresión de *hup*, como son *hupUV*, *hoxA* y *hupT*. Una descripción detallada del papel específico de las proteínas Hup y Hyp en *Rhizobium* ha sido publicada recientemente (10).

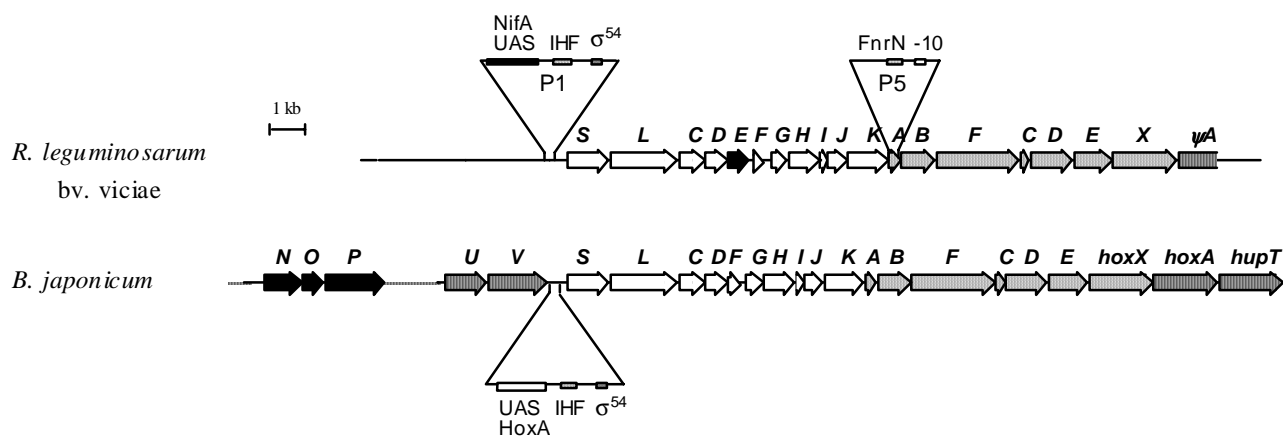


Fig. 1. Organización genética de las regiones *hup* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *B. japonicum*. Las flechas indican el tamaño y dirección de transcripción de los genes. Los genes *hyp* se indican mediante relleno punteado. Los genes reguladores se indican mediante barras verticales. Los genes en negro son genes posiblemente implicados en el transporte de Ni característicos de *B. japonicum* o de *R. leguminosarum*. Características relevantes de los promotores P1 y P5 de *R. leguminosarum* y del promotor principal de *B. japonicum* se indican en las regiones aumentadas (véase texto).

Tabla 1. Funciones de los genes *hup* en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* y *Bradyrhizobium japonicum*

Gen				Función <sup>c</sup>
<i>R. leguminosarum</i>	<i>B. japonicum</i>	Tamaño <sup>a</sup>	Identidad (%) <sup>b</sup>	
	<i>hupN</i>	40		(?) Transporte de Ni
	<i>hupO</i>	19		(?) Transporte de Ni
	<i>hupP</i>	63.5		(?) Transporte de Ni
	<i>hupU</i>	35.5		Regulación (H <sub>2</sub> asa sensora)
	<i>hupV</i>	52		Regulación (H <sub>2</sub> asa sensora)
<i>hupS</i>	<i>hupS</i>	34.5	89	Hidrogenasa, subunidad pequeña
<i>hupL</i>	<i>hupL</i>	66	89	Hidrogenasa, subunidad grande
<i>hupC</i>	<i>hupC</i>	28	67	Citocromo <i>b</i>
<i>hupD</i>	<i>hupD</i>	22	65	Peptidasa específica de HupL
<i>hupE</i>		19		(?) Transporte de Ni
<i>hupF</i>	<i>hupF</i>	10.5	45	
<i>hupG</i>	<i>hupG</i>	16	48	
<i>hupH</i>	<i>hupH</i>	30.5	51	
<i>hupI</i>	<i>hupI</i>	8	70	Rubredoxina
<i>hupJ</i>	<i>hupJ</i>	18.5	45	
<i>hupK</i>	<i>hupK</i>	39	32	(?) Proteína de andamiaje
<i>hypA</i>	<i>hypA</i>	12.5	49	
<i>hypB</i>	<i>hypB</i>	32.5	56	Unión a Ni
<i>hypF</i>	<i>hypF</i>	80.5	51	Procesamiento de hidrogenasa
<i>hypC</i>	<i>hypC</i>	8	63	Procesamiento de hidrogenasa
<i>hypD</i>	<i>hypD</i>	43.5	73	Procesamiento de hidrogenasa
<i>hypE</i>	<i>hypE</i>	36.5	77	Procesamiento de hidrogenasa
<i>hypX</i>	<i>hoxX</i>	62	55	Procesamiento de hidrogenasa
$\psi$ <i>hoxA</i> <sup>d</sup>	<i>hoxA</i>	53	57 <sup>e</sup>	Regulación (activador)
	<i>hupT</i>	50		Regulación (represor)

<sup>a</sup> Tamaño del producto génico (kDa) para *R. leguminosarum* (o *B. japonicum* en su caso)

<sup>b</sup> % aminoácidos idénticos en las secuencias de ambos organismos

<sup>c</sup> Los interrogantes (?)denotan funciones propuestas

<sup>d</sup> El  $\psi$ *hoxA* de *R. leguminosarum* carece de la mitad C-terminal.

<sup>e</sup> % identidad de los primeros 136 aas conservados en  $\psi$ *hoxA*.

## Otras funciones necesarias para la actividad hidrogenasa

### Transporte de níquel

La incorporación de níquel en el centro activo de la hidrogenasa es un paso esencial en la síntesis de la enzima. Los ambientes en los que se expresa la hidrogenasa rizobiana (nódulos, suelos agrícolas, condiciones de laboratorio) suelen contener bajos niveles de níquel, y las bacterias que oxidan hidrógeno en estos ambientes deben poseer un sistema de captación de níquel eficiente. En *B. japonicum* se ha identificado una agrupación génica (*hupNOP*) implicada en el metabolismo de níquel (25, 26). Aunque no se ha podido demostrar un papel directo de estos genes en el transporte de Ni, resulta interesante notar que HupN muestra un alto grado de homología con proteínas descritas en *Ralstonia eutropha* (HoxN, 27) y *Helicobacter pylori* (NixA, 28). Se ha podido demostrar que HoxN y NixA son capaces de mediar transporte de Ni cuando se expresan en *E. coli* (28, 29). Estos datos sugieren que HupN podría ser un transportador de Ni, con el concurso de HupO y HupP. Dado que el valor de  $K_m$  descrito para células de *B. japonicum* es relativamente alto (62  $\mu\text{M}$ ) y que HoxN y NixA son transportadores de Ni de alta afinidad ( $K_m$  0.34  $\mu\text{M}$  y 0.011  $\mu\text{M}$ , respectivamente) y baja capacidad, es posible que la captación de Ni mediada por HupN en *B. japonicum* pudiera quedar enmascarada por la presencia de un segundo sistema funcional en esta bacteria.

En *R. leguminosarum* los estudios de transporte de níquel para la síntesis de la hidrogenasa han sido dificultados por la expresión específica de simbiosis del sistema *hup*. Se ha podido establecer claramente que la disponibilidad de níquel limita la expresión de la hidrogenasa a nivel del procesamiento de las subunidades de la enzima (Fig. 2; 30). De hecho, no se observó un procesamiento completo de las subunidades excepto a concentraciones fitotóxicas (por encima de 1 mM), lo que indica que el suministro de níquel al bacterioide es un factor limitante para el proceso. no obstante, no está claro si esta limitación se debe al componente bacteriano o vegetal de la simbiosis.

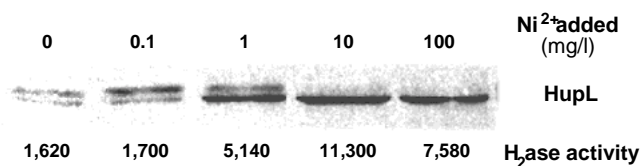


Fig. 2. Efecto del níquel en el procesamiento y actividad de la hidrogenasa en bacteroides de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. El Ni<sup>2+</sup> se adicionó a la solución nutritiva de plantas. Las formas procesada y no procesada de HupL se visualizaron por inmunoensayo utilizando un antisuero contra la proteína HupL de *B. japonicum*. La actividad hidrogenasa de los bacteroides se expresa como nmoles de hidrógeno oxidado por hora y por mg proteína.

### Translocación de la hidrogenasa

Otro aspecto importante para la síntesis de la hidrogenasa es la translocación de la enzima a la cara periplásmica de la membrana. Este proceso está mediado por el péptido señal de HupS. Las características de este péptido señal, situado en el extremo N-terminal de las subunidades del tipo HupS de diferentes hidrogenasas son poco corrientes (31). Pese a que conservan la estructura general de los péptidos señal normales, son mucho más largos (27-50 aminoácidos) que los reconocidos por el sistema secretor normal Sec (18-26 aminoácidos), y presentan un motivo con dos argininas (R-R-x-F-x-K). Este motivo está conservado en el dominio N-terminal de todas las subunidades pequeñas de las hidrogenasas [NiFe], incluyendo las de *R. leguminosarum* y *B. japonicum*. El análisis por medio de mutantes demuestra que el motivo de argininas es esencial para que se exporte la enzima (31). Posteriormente, trabajando con membranas de tilacoides de maíz, se identificó un nuevo tipo de sistema de translocación de proteínas que contienen este tipo de péptido señal (32). En *E. coli* se identificaron genes (genes *tat*, de *twin arginine translocation*) que codifican un sistema de translocación homólogo que media la translocación de la hidrogenasa al periplasma (33). En *E. coli* se cree que participa un canal de membrana (TatC) junto con otras proteínas (TatA, TatB, TatD) que actuarían como ramas en la etapa de reconocimiento de la vía de secreción (34). Genes similares a *tat* han sido identificados en *R. leguminosarum*, y su implicación no sólo en la exportación de la hidrogenasa, sino en el establecimiento de la simbiosis, ha sido demostrada (35).

#### Regulación de la expresión de la hidrogenasa

El análisis del sistema hidrogenasa en *Rhizobium* ha permitido establecer la existencia de mecanismos de regulación que controlan la expresión de Hup en células simbióticas y en vida libre. Se ha observado síntesis de la hidrogenasa en dos condiciones fisiológicas. En primer lugar, cultivos en vida libre de *B. japonicum* inducen actividad hidrogenasa en respuesta a condiciones microaeróbicas en presencia de hidrógeno y trazas de níquel. Esta expresión en células vegetativas no ha podido observarse en *R. leguminosarum*. En segundo lugar, la actividad hidrogenasa también se induce en bacteroides en el interior de los nódulos de leguminosas, donde el hidrógeno generado por la nitrogenasa actúa como sustrato de la enzima. Ambos tipos de inducción responden a mecanismos de regulación muy distintos.

La expresión de la hidrogenasa en células vegetativas de *B. japonicum* se controla por medio de un mecanismo complejo que responde a la presencia simultánea de tres señales ambientales: hidrógeno, bajas tensiones de oxígeno y trazas de níquel (22). Pese a que no se dispone de un modelo completo de regulación, se sabe que bajo estas condiciones la expresión de *hupSL* requiere  $\sigma^{54}$ , IHF (36) y HoxA (37). HoxA es un activador transcripcional de la familia de NtrC que se une a ADN, y se han descrito también proteínas homólogas en otros sistemas oxidadores de hidrógeno (38,39). Además de HoxA, otras tres proteínas afectan a la expresión de los genes *hup* en células vegetativas: HupU, HupV, y HupT (Fig. 1). El complejo HupUV constituye una pseudohidrogenasa capaz de responder a

niveles adecuados de oxígeno, hidrógeno y níquel (40). La proteína HupT ha sido descrita como un represor de la actividad Hup en otros organismos (41, 42) y en *B. japonicum* (43). Esta proteína presenta las características de una histidina quinasa, incluyendo su capacidad de autofosforilación. Así, el modelo de regulación en este organismo podría ser similar al descrito para *Ralstonia eutropha* (42). El complejo sensor HupUV transduciría la presencia de condiciones ambientales adecuadas para la síntesis de la hidrogenasa y resultaría en activación de HoxA, probablemente por modificación de la actividad represora de HupT. La proteína HoxA activa promovería a su vez la transcripción de los genes estructurales de la hidrogenasa y del resto de genes aguas abajo, resultando en síntesis de hidrogenasa. Este modelo de regulación no es aplicable a *R. leguminosarum*. En esta bacteria no se han encontrado los genes *hupUV* o *hupT*, y sólo se encuentra un pseudogene no funcional (*ψhoxA*) a continuación de *hypX*. Consecuentemente, nunca se ha podido observar inducción de los genes *hup* en células vegetativas de *R. leguminosarum* (44).

La expresión simbiótica de los genes *hup* se ha estudiado con detalle en *R. leguminosarum*. En este sistema se han identificado dos promotores principales (Fig. 1): i) un promotor -12/-24 (denominado P1), que controla la expresión simbiótica del operón que contiene los genes estructurales y varios genes adicionales localizados aguas abajo. Experimentos de hibridación “in situ” permitieron demostrar que los genes *hupSL* se coexpresan tanto espacial como temporalmente con los genes estructurales de la nitrogenasa en nódulos de guisante (45), lo que sugiere la presencia de un regulador común para los genes *hup* y *nif*. Además, experimentos de expresión heteróloga en *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, y *R. etli* permitieron concluir que en *R. leguminosarum* la transcripción de los genes estructurales de la hidrogenasa se controla mediante un promotor del tipo  $\sigma^{54}$  activado por NifA con la ayuda de IHF (44); ii) Un segundo promotor (denominado P5) ha sido identificado aguas arriba de *hypB*, dentro de la secuencia codificante de *hypA*. P5 es un promotor de tipo Fnr que contiene una secuencia consenso del tipo “caja anaeróbica” que controla la expresión de los genes *hypBFCDEX*. Se ha podido demostrar que FnrN, un activador transcripcional homólogo a Fnr de *E. coli*, activa P5 en bacteroides y en células vegetativas expuestas a condiciones microaeróbicas (46). Existen dos copias funcionales del gen (*fnrN1* y *fnrN2*) en *R. leguminosarum* UPM791 (47). Un doble mutante afectado en ambas copias induce la formación de nódulos inefectivos que carecen de actividad hidrogenasa y nitrogenasa. Además de regular los genes *hypBFCDEX*, FnrN también controla la expresión microaeróbica del operón *fixNOQP*, implicado en la síntesis de una citocromo oxidasa de tipo *cbb<sub>3</sub>* de alta afinidad esencial para la respiración de los bacteroides (47). Estos resultados aportan evidencias adicionales de la estrecha relación entre los sistemas hidrogenasa y nitrogenasa en *R. leguminosarum*.

En el caso de *B. japonicum* la regulación de la expresión de la actividad Hup en simbiosis no se ha clarificado completamente. Se ha demostrado que HoxA no es esencial para la transcripción de los genes estructurales de la hidrogenasa en nódulos de soja (37, 48). Además se ha propuesto que la

hidrogenasa y la nitrogenasa están correguladas por medio de FixK<sub>2</sub> (48), aunque la posibilidad de que NifA afecte a la expresión de *hupSL* en nódulos no ha sido descartada.

Otro factor que afecta a la expresión de la hidrogenasa en *R. leguminosarum* es la leguminosa huésped. Se ha demostrado que algunos huéspedes son más permisivos que otros para la expresión de la hidrogenasa. Se ha descrito un control del fenotipo Hup por la planta huésped para los simbioses de guisantes, soja, caupí y judía (10). Las bases moleculares de este fenómeno se desconocen hasta la fecha. En el caso de *R. leguminosarum* bv. *viciae* se ha demostrado que la cepa UPM791 induce actividad hidrogenasa en bacteroides de guisante pero es incapaz de expresar esta actividad en lentejas (49).

### Aplicaciones biotecnológicas

Se ha estimado que las pérdidas energéticas asociadas con la producción de hidrógeno por nódulos de leguminosas alcanzan el 40-60% de la energía disponible para la fijación de nitrógeno (50). Estas pérdidas energéticas constituyen la fuente principal de ineficiencia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, y aquellas cepas bacterianas que expresan actividad hidrogenasa deberían poder llevar a cabo una fijación de nitrógeno más eficiente al reutilizar el hidrógeno producido por la nitrogenasa (51). La capacidad de oxidar hidrógeno se considera en general como una propiedad beneficiosa de los organismos diazotróficos, tanto en estado simbiótico como en vida libre, y se han postulado varios mecanismos por los cuales la presencia de una hidrogenasa podría aumentar la eficiencia global de la fijación de nitrógeno (52, 53). Estos incluyen: i) provisión de una fuente adicional de energía y poder reductor para el sistema de fijación de nitrógeno; ii) protección de la nitrogenasa frente al oxígeno; iii) prevención de la inhibición por hidrógeno de la reducción de dinitrógeno catalizada por la nitrogenasa. Las evidencias experimentales directas o indirectas acumuladas en favor de estos beneficios potenciales del sistema hidrogenasa han sido discutidos en profundidad en anteriores revisiones (5,8,9). Aunque se ha demostrado convincentemente mediante experimentos “in vitro” que el sistema hidrogenasa puede potencialmente mejorar la fijación de nitrógeno, la contribución real del reciclaje de hidrógeno al incremento de productividad de las leguminosas noduladas continúa siendo objeto de debate. Comparando grupos de cepas Hup<sup>+</sup> y Hup<sup>-</sup> de *B. japonicum*, o distintas cepas salvajes, o mutantes Hup<sup>-</sup> casi isogénicos (excepto por la presencia del sistema Hup), Evans y colaboradores presentaron evidencias convincentes de que el sistema *hup* tiene un efecto positivo sobre la productividad de la soja (6, 54). Fue particularmente significativo un experimento en el que plantas de soja se dejaron crecer hasta madurez en grandes macetones de cemento, en el que se pudieron medir aumentos significativos (1%) en la producción de semilla y en el contenido total en nitrógeno cuando las plantas de soja se inoculaban con una revertiente Hup<sup>+</sup> de *B. japonicum* vs. el mutante Hup<sup>-</sup> correspondiente (55). También se han observado efectos positivos de la actividad

hidrogenasa sobre la productividad en el sistema de judías (*Phaseolus vulgaris*) (56, 57). Sin embargo, en un caso en particular, se encontró un efecto negativo del sistema *hup* sobre la productividad de soja, al usar un mutante  $Hup^-$  diferente como control (58). Tampoco se encontraron aumentos significativos de la productividad asociados al sistema *hup* en experimentos con cepas  $Hup^+$  de *R. leguminosarum* (59, 60). Estas diferencias pueden achacarse a variaciones en las condiciones experimentales, como el uso de cepas bacterianas que no reciclan hidrógeno eficientemente, o en las que el reciclado de hidrógeno no se encuentra acoplado a la producción de ATP en la leguminosa huésped, la recogida de las plantas antes de llegar a madurez, o el uso de un número insuficiente de réplicas para obtener resultados estadísticamente significativos, en particular en experimentos de campo, y en general el uso de cepas  $Hup^-$  control inadecuadas (6, 8). En este sentido, se ha hecho repetido hincapié sobre la necesidad de comparar cepas  $Hup^+$  y  $Hup^-$  que sean isogénicas excepto por el carácter *Hup* (6). Sin embargo, dado que ahora sabemos que la capacidad de oxidar hidrógeno viene codificada por un sistema multigénico, los controles adecuados deberían ser mutantes  $Hup^-$  delecionados de la agrupación *hup* completa, en lugar de mutantes afectados en un solo gen. Alternativamente, el efecto de *hup* sobre la productividad de leguminosas podría estudiarse comparando cepas silvestres  $Hup^-$  con derivados  $Hup^+$  obtenidos mediante manipulación genética por incorporación de la agrupación *hup* completa. La construcción de dichas cepas es el primer paso en el objetivo biotecnológico de extender el fenotipo *Hup* a los *Rhizobium* que nodulan leguminosas agrícolamente importantes y que carecen de sistema *hup*.

La transferencia de los genes *hup* a fondos genéticos heterólogos viene facilitada por los progresos obtenidos en la identificación y caracterización de los determinantes genéticos de la síntesis de la hidrogenasa, y en la regulación de su expresión (véase más arriba). Se han usado diversas estrategias para transferir el sistema *hup* desde cepas  $Hup^+$  de *B. japonicum* y *R. leguminosarum* bv. *viciae* a cepas receptoras  $Hup^-$  de diferentes *Rhizobium*. La transferencia del sistema *hup* en base plasmídica choca frecuentemente con problemas de inestabilidad del carácter *Hup* en los nódulos en ausencia de presión selectiva para el mantenimiento del plásmido. La inestabilidad de los cósmidos derivados de pLAFR1 conteniendo el sistema *hup* en nódulos parece depender del huésped, y es mayor en *S. meliloti* y *B. japonicum* ( $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ ) (61) que en *R. etli* o *Mesorhizobium loti* ( $10^{-1}$ ) (62, 63). La tasa de mantenimiento del fenotipo *Hup* puede mejorarse por medio de la estabilización de los cósmidos con genes *par* (64). Cuando se han utilizado plásmidos nativos de *R. leguminosarum* que contienen los genes *hup*, la presencia de ADN no *hup* impone una carga metabólica adicional a la cepa receptora que puede enmascarar el efecto del sistema *hup* sobre el comportamiento simbiótico (60, 65-67). La integración de la agrupación *hup* en el cromosoma parece ser la estrategia de elección, aunque su gran tamaño (más de 15 kb) hace difícil experimentos de recombinación “in vitro” (68).

En nuestras manos, la estrategia más rápida y flexible para la integración del sistema *hup* en el cromosoma de cepas receptoras es la utilización de mini-transposones (69, 70). Los genes a integrar se clonan entre las dos repeticiones invertidas terminales de Tn5, adyacentes a un gen marcador de resistencia a antibiótico. Dado que el resto del sistema de transposición se sitúa fuera de las repeticiones, el procedimiento resulta en una integración estable. Usando vectores suicida adecuados finalmente puede transferirse cualquier fragmento de ADN al cromosoma. Este sistema nos ha permitido integrar las 18 kb de la agrupación *hup* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* UPM791 en el cromosoma de cepas Hup<sup>-</sup> de *B. japonicum*, *M. ciceri*, *M. loti*, *R. leguminosarum* bv. *viciae* y bv. *trifolii*, *R. etli* y *S. meliloti* (71).

El análisis de la expresión de la hidrogenasa en estas nuevas cepas Hup<sup>+</sup> en simbiosis con sus correspondientes leguminosas puso de manifiesto la existencia de una amplia gama de niveles de expresión dependiente de la especie bacteriana e incluso de la cepa. A partir de los vectores conteniendo minitransposones *hup* es posible eliminar el gen de resistencia a antibiótico para construir cepas Hup<sup>+</sup> respetuosas con el medio ambiente que pueden usarse en ensayos de campo o para su comercialización.

La integración estable del sistema *hup* en el cromosoma todavía no asegura la adquisición de la capacidad de reciclar hidrógeno por parte de las cepas receptoras. Es necesario también que exista una expresión eficiente de los genes de la hidrogenasa y de la actividad hidrogenasa en simbiosis con las correspondientes leguminosas huésped. Como se ha indicado más arriba, el fondo genético de la bacteria afecta drásticamente los niveles de expresión heteróloga del sistema *hup* de *R. leguminosarum*. La base molecular de este control por el huésped de la expresión de *hup* se desconoce, aunque las diferencias observadas podrán tener que ver con diferencias en regulación de los genes *hup* por NifA y FnrN, los dos activadores principales del sistema *hup* de *R. leguminosarum*. Por lo que sabemos de la regulación simbiótica de la expresión de los genes *hup*, otros dos factores podrían controlar también la expresión de los genes de la hidrogenasa en las nuevas cepas Hup<sup>+</sup> así generadas: i) la disponibilidad de níquel para la planta huésped limita severamente la expresión de la hidrogenasa de *R. leguminosarum* en la simbiosis con *Pisum sativum* (véase más arriba) y posiblemente también en otras simbiosis, como el sistema *M. Loti-Lotus corniculatus* (Brito et al. datos no publicados); ii) la leguminosa huésped puede afectar a la expresión de la hidrogenasa (véase también más arriba). En resumen, aunque las herramientas para introducir el sistema *hup* en cualquier cepa de *Rhizobium* en forma estable están disponibles, todavía se necesita seguir investigando para lograr una expresión eficiente del sistema *hup* en los diferentes huéspedes y para poder evaluar su efecto sobre la producción de leguminosas antes de intentar acometer la obtención de una cepa inoculante superior y comercialmente atractiva.

## Referencias

1. Schlegel, H. G., and K. Schneider. 1978. Distribution and physiological role of hydrogenases in microorganisms. In *Hydrogenases: Their Catalytic Activity, Structure and Function*, H. G. Schlegel and K. Schneider (eds.). Erich Goltze, Göttingen. p. 15-44.
2. Aragno, M. 1998. The aerobic, hydrogen-oxidizing (knallgas) bacteria. In *Techniques in Microbial Ecology*, R. S. Burlage et al. (eds.). Oxford University Press, Oxford. p. 79-112.
3. Adams, M. W. W., L. E. Mortenson, and J.-S. Chen. 1981. Hydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta.* 594: 105-176.
4. Stam, H., A. H. Stouthamer, and H. W. van Verseveld. 1987. Hydrogen metabolism and energy costs of nitrogen fixation. *FEMS Microbiol. Rev.* 46: 73-92.
5. Evans, H. J., A. R. Harker, H. Papen, S. A. Russell, F. J. Hanus, and M. Zuber. 1987. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Annu. Rev. Microbiol.* 41: 335-362.
6. Evans, H. J., S. A. Russell, F. J. Hanus, and T. Ruiz-Argüeso. 1988. The importance of hydrogen recycling in nitrogen fixation by legumes. In *World Crops: Cool Season Food Legumes*, R. J. Summerfield (ed.). Kluwer Academic Publ., Boston. p. 777-791.
7. O'Brian, M. R., and R. J. Maier. 1988. Hydrogen metabolism in *Rhizobium*: Energetics, regulation, enzymology and genetics. *Adv. Microbial Physiol.* 29: 1-52.
8. Arp, D. J. 1992. Hydrogen cycling in symbiotic bacteria. In *Biological Nitrogen Fixation*, G. Stacey, R. H. Burris, and H. J. Evans (eds.). Chapman and Hall, New York. p. 432-460.
9. Van Soom, C., N. Rumjanek, J. Vanderleyden, and M. C. P. Neves. 1993. Hydrogenase in *Bradyrhizobium japonicum*: Genetics, regulation and effect on plant growth. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 9: 615-624.
10. Maier, R. J., and E. W. Triplett. 1996. Toward more productive, efficient, and competitive nitrogen-fixing symbiotic bacteria. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 15: 191-234.
11. Friedrich, B., and E. Schwartz. 1993. Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 351-383.
12. Sawers, G. 1994. The hydrogenases and formate dehydrogenases of *Escherichia coli*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 66: 57-88.

13. Vignais, P. M., and B. Toussaint. 1994. Molecular biology of membrane-bound H<sub>2</sub> uptake hydrogenases. *Arch. Microbiol.* 161: 1-10.
14. Volbeda, A., M.-H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. 1995. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Nature.* 373: 580-587.
15. Fontecilla-Camps, J. C., M. Frey, E. Garcin, C. Hatchikian, Y. Montet, C. Piras, X. Vernede, and A. Volbeda. 1997. Hydrogenase: A hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action? *Biochimie.* 79: 661-666.
16. Montet, Y., P. Amara, A. Volbeda, X. Vernede, E. C. Hatchikian, M. J. Field, M. Frey, and J. C. Fontecilla-Camps. 1997. Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nature Struct. Biol.* 4: 523-526.
17. Navarro, R. B., A. A. T. Vargas, E. C. Schroeder, and P. Van Berkum. 1993. Uptake hydrogenase (Hup) in common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbioses. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 4161-4165.
18. Van Berkum, P., R. B. Navarro, and A. A. T. Vargas. 1994. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup<sup>+</sup>) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 554-561.
19. Sun, J.-H., B.-J. Chen, and H.-Y. Song. 1989. Characteristics of hydrogen-uptake system of *Rhizobium astragali* 109. *Acta Phytophysiol. Sinica.* 15: 382-387.
20. Ruiz-Argüeso, T., D. W. Emerich, and H. J. Evans. 1979. Hydrogenase system in legume nodules: a mechanism of providing nitrogenase with energy and protection from oxygen damage. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 86: 259-264.
21. Mínguez, I., and T. Ruiz-Argüeso. 1980. Relative energy efficiency of nitrogen fixation by nodules of chickpea (*Cicer arietinum* L.) produced by different strains of *Rhizobium*. *Curr. Microbiol.* 4: 169-171.
22. Maier, R. J. 1986. Biochemistry, regulation and genetics of hydrogen oxidation in *Rhizobium*. *CRC Crit. Rev. Biotechnol.* 3: 17-38.
23. Leyva, A., J. M. Palacios, T. Mozo, and T. Ruiz-Argüeso. 1987. Cloning and characterization of hydrogen uptake genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 169: 4929-4934.

24. Cantrell, M. A., R. A. Haugland, and H. J. Evans. 1983. Construction of a *Rhizobium japonicum* gene bank and use in the isolation of a hydrogen uptake gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 181-185.
25. Fu, C., and R. J. Maier. 1991. Identification of a locus within the hydrogenase gene cluster involved in intracellular nickel metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. Appl. Environ. Microbiol. 57: 3502-3510.
26. Fu, C., S. Javedan, F. Moshiri, and R. Maier. 1994. Bacterial genes involved in incorporation of nickel into hydrogenase enzyme. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 5099-5103.
27. Eitinger, T., and B. Friedrich. 1991. Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of a high-affinity nickel transport gene from *Alcaligenes eutrophus*. J. Biol. Chem. 266: 3222-3227.
28. Mobley, H. L. T., R. M. Garner, and P. Bauerfeind. 1995. *Helicobacter pylori* nickel-transport gene *nixA*: Synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth conditions. Mol. Microbiol. 16: 97-109.
29. Wolfram, L., B. Friedrich, and T. Eitinger. 1995. The *Alcaligenes eutrophus* protein HoxN mediates nickel transport in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 177: 1840-1843.
30. Brito, B., J. M. Palacios, E. Hidalgo, J. Imperial, and T. Ruiz-Argüeso. 1994. Nickel availability to pea (*Pisum sativum* L.) plants limits hydrogenase activity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* bacteroids by affecting the processing of the hydrogenase structural subunits. J. Bacteriol. 176: 5297-5303.
31. Niviere, V., S.-L. Wong, and G. Voordouw. 1992. Site-directed mutagenesis of the hydrogenase signal peptide consensus box prevents export of a  $\beta$ -lactamase fusion protein. J. Gen. Microbiol. 138: 2173-2183.
32. Settles, A. M., A. Yonetani, A. Baron, D. R. Bush, K. Cline, and R. Martienssen. 1997. Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. Science. 278: 1467-1470.
33. Sargent, F., E. G. Bogsch, N. R. Stanley, M. Wexler, C. Robinson, B. C. Berks, and T. Palmer. 1998. Overlapping functions of components of a bacterial Sec-independent protein export pathway. EMBO J. 17: 3640-3650.
34. Chanal, A., C.-L. Santini, and L.-F. Wu. 1998. Potential receptor function of three homologous components, TatA, TatB, and TatE, of the twin-arginine signal sequence-dependent metalloenzyme translocation pathway in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 30: 673-678.

35. Meloni, S., L. Rey, S. Sidler, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso, and J.M. Palacios. 2003. The twin-arginine translocation (TAT) system is essential for *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* (in press).
36. Black, L. K., and R. J. Maier. 1995. IHF- and RpoN-dependent regulation of hydrogenase expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* 16: 405-413.
37. van Soom, C., P. de Wilde, and J. Vanderleyden. 1997. HoxA is a transcriptional regulator for expression of the *hup* structural genes in free-living *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* 23: 967-977.
38. Eberz, G., and B. Friedrich. 1991. Three trans-acting functions control hydrogenase synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 173: 1845-1854.
39. Richaud, P., A. Colbeau, B. Toussaint, and P. M. Vignais. 1991. Identification and sequence analysis of the *hupR1* gene, which encodes a response regulator of the NtrC family required for hydrogenase expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 173: 5928-5932.
40. Black, L. K., C. Fu, and R. J. Maier. 1994. Sequences and characterization of *hupU* and *hupV* genes of *Bradyrhizobium japonicum* encoding a possible nickel-sensing complex involved in hydrogenase expression. *J. Bacteriol.* 176: 7102-7106.
41. Elsen, S., A. Colbeau, and P. Vignais. 1997. Purification and in vitro phosphorylation of HupT, a regulatory protein controlling hydrogenase gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 179: 968-971.
42. Lenz, O., and B. Friedrich. 1998. A novel multicomponent system mediates H<sub>2</sub> sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 12474-12479.
43. Van Soom, C., I. Lerouge, J. Vanderleyden, T. Ruiz-Argüeso, and J.M. Palacios. 1999. Identification and characterization of *hupT*, a gene involved in negative regulation of hydrogen oxidation in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 181: 5085-5089.
44. Brito, B., M. Martinez, D. Fernandez, L. Rey, E. Cabrera, J. M. Palacios, J. Imperial, and T. Ruiz-Argüeso. 1997. Hydrogenase genes from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* are controlled by the nitrogen fixation regulatory protein NifA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 6019-6024.
45. Brito, B., J. M. Palacios, J. Imperial, T. Ruiz-Argüeso, W.-C. Yang, T. Bisseling, H. Schmitt, V. Kerl, T. Bauer, W. Kokotek, and W. Lotz. 1995. Temporal and spatial co-expression of hydrogenase and nitrogenase genes from *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in pea (*Pisum sativum* L.) root nodules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 235-240.

46. Hernando, Y., J.-M. Palacios, J. Imperial, and T. Ruiz-Argüeso. 1995. The *hypBFCDE* operon from *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* is expressed from an Fnr-type promoter that escapes mutagenesis of the *fnrN* gene. J. Bacteriol. 177: 5661-5669.
47. Gutierrez, D., Y. Hernando, J.-M. Palacios, J. Imperial, and T. Ruiz-Argüeso. 1997. FnrN controls symbiotic nitrogen fixation and hydrogenase activities in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* UPM791. J. Bacteriol. 179: 5264-5270.
48. Durmowicz, M. C., and R. J. Maier. 1997. Roles of HoxX and HoxA in biosynthesis of hydrogenase in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. 179: 3676-3682.
49. López, M., V. Carbonero, E. Cabrera, and T. Ruiz-Argüeso. 1983. Effects of host on the expression of the H<sub>2</sub>-uptake hydrogenase of *Rhizobium* in legume nodules. Plant Sci. Lett. 29: 191-199.
50. Schubert, K. R., and H. J. Evans. 1976. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73: 1207-1211.
51. Albrecht, S. L., R. J. Maier, F. J. Hanus, S. A. Russell, D. W. Emerich, and H. J. Evans. 1979. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. Science. 203: 1255-1257.
52. Dixon, R. O. D. 1972. Hydrogenase in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. Arch. Microbiol. 85: 193-201.
53. Dixon, R. O. D. 1976. Hydrogenases and efficiency of nitrogen fixation in aerobes. Nature. 262: 173.
54. Eisbrenner, G., and H. J. Evans. 1983. Aspects of hydrogen metabolism in nitrogen-fixing legumes and other plant-microbe associations. Annu. Rev. Plant Physiol. 34: 105-136.
55. Evans, H. J., F. J. Hanus, R. A. Haughland, M. A. Cantrell, L.-S. Xu, S. A. Russell, G. R. Lambert, and A. R. Harker. 1985. Hydrogen recycling in nodules affects nitrogen fixation and growth of soybeans. In Proceedings of the World Soybean Conference, R. Shibles (ed.), vol. 3. Westview Press, Boulder, CO. p. 935-942.
56. Hungria, M., and M. C. P. Neves. 1987. Cultivar and *Rhizobium* strain effect on nitrogen fixation and transport in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Soil. 103: 111-122.
57. Hungria, M., and A. P. Ruschel. 1989. Acetylene reduction, hydrogen evolution and nodule respiration in *Phaseolus vulgaris*. Biol. Fert. Soils. 7: 351-358.

58. Drevon, J. J., V. C. Kalia, M. O. Heckmann, and L. Salsac. 1987. Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of *Glycine* and *Vigna* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 610-612.
59. Nelson, L. M. 1983. Hydrogen recycling by *Rhizobium leguminosarum* isolates and growth and nitrogen contents of pea plants (*Pisum sativum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 856-861.
60. Cunningham, S. D., Y. Kapulnik, N. J. Brewin, and D. A. Phillips. 1985. Uptake hydrogenase activity determined by plasmid pRL6JI in *Rhizobium leguminosarum* does not increase symbiotic nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 791-794.
61. Lambert, G. R., A. R. Harker, M. A. Cantrell, F. J. Hanus, S. A. Russell, R. A. Haugland, and H. J. Evans. 1987. Symbiotic expression of cosmid-borne *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 422-428.
62. Leyva, A., J. M. Palacios, J. Murillo, and T. Ruiz-Argüeso. 1990. Genetic organization of the hydrogen uptake (*hup*) cluster from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* 172: 1647-1655.
63. Monza, J., P. Diaz, O. Borsani, T. Ruiz-Argüeso, and J. M. Palacios. 1997. Evaluation and improvement of the energy efficiency of nitrogen fixation in *Lotus corniculatus* nodules induced by *Rhizobium loti* strains indigenous to Uruguay. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 13: 565-571.
64. Kent, A. D., M. L. Wojtasiak, E. A. Robleto, and E. W. Triplett. 1998. A transposable partitioning locus used to stabilize plasmid-borne hydrogen oxidation and trifoliotoxin production genes in a *Sinorhizobium* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1657-1662.
65. Bedmar, E. J., N. J. Brewin, and D. A. Phillips. 1984. Effect of plasmid pIJ1008 from *Rhizobium leguminosarum* on symbiotic functions of *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 876-878.
66. Miksch, G., and P. Lentzsch. 1988. Transfer of *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmids to *R. meliloti* and stability of resident and transferred plasmids. *J. Basic Microbiol.* 28: 445-455.
67. Vasudev, S., M. L. Lodha, and K. R. Sreekumar. 1990. Transfer and expression of *Bradyrhizobium japonicum* uptake hydrogenase genes in *Cicer* rhizobia. *Indian J. Exp. Biol.* 28: 1040-1045.
68. Bhanu, N. V., S. P. S. Khanuja, and M. L. Lodha. 1994. Integration of *hup* genes into the genome of chickpea-*Rhizobium* through site-specific recombination. *J. Plant Biochem. Biotech.* 3: 19-24.

69. De Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik, and K. N. Timmis. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J. Bacteriol.* 172: 6568-6572.
70. Wilson, K. J., A. Sessitsch, J. C. Corbo, K. E. Giller, A. D. L. Akkermans, and R. A. Jefferson. 1995.  $\beta$ -glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology.* 141: 1691-1705.
71. Bascones, E., J. Imperial, T. Ruiz-Argueso, and J.M. Palacios. 2000. Generation of new hydrogen-recycling Rhizobiaceae strains by introduction of a novel *hup* minitransposon. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4292-4299.