X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno
Granada, 15-18 Junio 2004

Nuevos Confines de la Fijación Biológica de Nitrógeno

E. J. Bedmar Gómez · J. González López · C. Lluch Plá · B. Rodelas González

Nuevos Confines de la Fijación Biológica de Nitrógeno

X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno

Granada, España
15 - 18 de Junio de 2004

Organizan:

Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)
Universidad de Granada
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Granada, 2004

Nuevos Confines de la Fijación Biológica de Nitrógeno.
Libro de Resúmenes de la X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno, Granada, España, 15-18 de Junio de 2004.

Editores:

Eulogio Bedmar Gómez
Jesús González López
Carmen Lluch Plá
Mª Belén Rodelas González

Página web: http://www.ugr.es/local/sefin
Contacto: sefin@ugr.es

Diseño y mantenimiento de la web: Mª Belén Rodelas González

ISBN: 84-688-6707-1
Depósito Legal: GR-746/2004

Universidad de Granada, 2004

Impreso por: Copicentro Granada, S.L.

Maquetación y diseño gráfico: Mª Belén Rodelas González

La imagen de la portada corresponde a la obra "Sala de Dos Hermanas", propiedad del acuarelista granadino Jesús Rubio (http://jrubiocamara.tripod.com), cuyo uso ha sido amablemente cedido a la Organización por el autor. Queda prohibida la reproducción por cualquier medio de dicha imagen, sin permiso previo por escrito del autor.

X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno, Granada, España, 15-18 de Junio de 2004.

Comité Organizador:

Presidentes

Dr. Jesús González López	*Departamento de Microbiología* *Universidad de Granada*
Dra. Carmen Lluch Plá	*Departamento de Fisiología Vegetal* *Universidad de Granada*

Secretaria

Dra. Mª Belén Rodelas González	*Departamento de Microbiología* *Universidad de Granada*

Tesorero

Dr. Eulogio Bedmar Gómez	*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos* *Estación Experimental del Zaidín* *CSIC (Granada)*

Vocales

Dr. María Jesús Delgado Igeño	*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos* *Estación Experimental del Zaidín* *CSIC (Granada)*
Dr. José Antonio Herrera Cervera	*Departamento de Fisiología Vegetal* *Universidad de Granada*
Dra. María Victoria Martínez Toledo	*Departamento de Microbiología* *Universidad de Granada*
Dr. Antonio Ocaña Cabrera	*Departamento de Fisiología Vegetal* *Universidad de Granada*
Dra. Clementina Pozo Llorente	*Departamento de Microbiología* *Instituto del Agua* *Universidad de Granada*
Dr. Noel A. Tejera García	*Departamento de Fisiología Vegetal* *Universidad de Granada*

Comité Científico:

Dr. Francisco Castillo Rodríguez	*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular* *Universidad de Córdoba*
Dr. Manuel Chamber Pérez	*CIFA Las Torres-Tomejil, Sevilla*
Dra. María del Rosario de Felipe Antón	*Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal* *Centro de Ciencias Medioambientales* *CSIC (Madrid)*
Dr. José Olivares Pascual	*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos* *Estación Experimental del Zaidín* *CSIC (Granada)*
Dr. Claudino Rodríguez Barrueco	*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamamanca (IRNASA)* *CSIC (Salamanca)*
Dr. Tomás Ruiz Argüeso	*Departamento de Biotecnología* *Universidad Politécnica* *Madrid*

Comité asesor:

Dr. Pedro Aparicio Tejo (Universidad Pública de Navarra)
Dr. Manuel Becana Ausejo (E.E. Aula Dei, CSIC, Zaragoza)
Dr. Ildefonso Bonilla Mangas (Universidad Autónoma de Madrid)
Dr. Ezequiel Cabrera Ordóñez (Universidad Politécnica de Madrid)
Dra. Mercedes Fernández Pascual (C.C. Medioambietales, CSIC, Madrid)
Dr. Francisco J. Gutiérrez Mañero (Universidad San Pablo-CEU, Madrid)
Dr. Manuel Megías Guijo (Universidad de Sevilla)
Dr. Eugenio Mendes Ferreira (INIAP, Oeiras, Portugal)
Dr. José M. Palacios Alberti (Universidad Politécnica de Madrid)
Dr. Antonio J. Palomares Díaz (Universidad de Sevilla)
Dr. Ricardo Pérez Galdona (Universidad de La Laguna, Tenerife)
Dr. Manuel Sánchez Díaz (Universidad de Navarra)
Dr. Francisco Temprano Vera (CIFA Las Torres-Tomejil, Sevilla)
Dr. Nicolás Toro García (E.E. del Zaidín, CSIC, Granada)

Entidades colaboradoras:

Ayuntamiento de Granada
Caja Rural
Caja-Granada
Fundación Euroárabe
Hucoa-Erlöss
Jesús Rubio Acuarelas
Junta de Andalucía
Roche
VWR International

Índice.

Índice

Presentación. *16*

20 años de historia de la SEFIN *17*

Conferencias plenarias. *19*

C-1. Ecología evolutiva de la diazotrofía y de la nodulación. *21*
ROSENBLUETH, M., VINUESA, P., SILVA, C., LLORET, L., ORMEÑO, E., MARTÍNEZ, L., TORRES, C., MARTÍNEZ, J., ROGEL, M.A., TOLEDO, I., HERNÁNDEZ, I., Y MARTÍNEZ-ROMERO, E.

C-2. Control of root nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *22*
KONDOROSI, A., VINARDELL, J.M., COMPLAINVILLE, A., MAUNOURY, N., NIKOVICS, K., CAMPALANS, A., TARAYRE, S., D'ERFURTH, I., KEVEI, Z., VAUBERT, D., BROCARD, L., TRINH, H., RATET, P., MERGAERT, P., CRESPI, M., Y KONDOROSI, E.

Sesión I.
Ecología, diversidad y evolución de los microorganismos diazotróficos. *23*

SI-P1. Diversidad de microorganimos fijadores simbióticos de nitrógeno. *25*
MARTÍNEZ-MOLINA, E., MATEOS, P.F., VELAZQUEZ, E., TRUJILLO, M., Y RIVAS, R.

SI-P2. Los rizobios que nodulan con la soja en suelos de China. *26*
RUIZ-SAINZ, J.E., BELLOGÍN, R., BONILLA, I., CAMACHO, M., HIDALGO, A., LUCENA J.J., NOREEN, S., SCHLAMAN, H., THOMAS-OATES, J.E., YANG, S.S., Y ZHOU, J.C.

SI-1. Biodiversidad y análisis taxonómico de cepas del actinomiceto *Frankia*. *27*
IGUAL, J. M., VALVERDE, A., SANTA REGINA, I., VELÁZQUEZ, E., Y RODRÍGUEZ-BARRUECO, C.

SI-2. Análisis de la biodiversidad de poblaciones de *Bradyrhizobium* que nodulan *Lupinus albus* en el Norte de España. *28*
MARTÍNEZ-MOLINA, E., GANTOIS, I., RIVAS, R., GOMIS, V., LEÓN-BARRIOS, M., TRUJILLO, M., MATEOS, P. F., Y VELÁZQUEZ, E.

SI-3. Caracterización de cepas que nodulan *Arachis hypogaea*. *29*
ÁLVAREZ, E. R., RIVAS-BOYERO, A. A., RIVAS, R., MATEOS, P.F., MARTÍNEZ-MOLINA, E., Y VELÁZQUEZ, E.

SI-4. Caracterización de una nueva especie del género *Rhizobium* aislada de *Acacia* en Argentina. *30*
PEIX, A., RIVAS, R., ABRIL, A., WILLEMS, A., Y VELÁZQUEZ, E.

SI-5. *Rhizobium lusitanum*, una nueva especie de *Rhizobium* aislada de nódulos de *Phaseolus vulgaris*. *31*
VALVERDE, A., IGUAL, J. M., RODRÍGUEZ-BARRUECO, C., SANTA REGINA, I., CERVANTES, E., Y VELÁZQUEZ, E.

SI-6. Nodulación de *Citysus scoparius* y *Phaseolus vulgaris* por cepas del patógeno humano *Ochrobactrum anthropi*. 32
VELÁZQUEZ, E., ZURDO-PIÑEIRO, J.L., RIVAS, R., TRUJILLO, M., VIZCAÍNO, N., CARRASCO, J.A., CHAMBER, M., LUDEÑA, D., MUÑOZ DE LA PASCUA, L., JIMÉNEZ, R., WILLEMS, A., MATEOS, P.F., Y MARTÍNEZ-MOLINA, E.

SI-7. Caracterización de cepas de *Bradyrhizobium* capaces de nodular *Pachyrhizus ahipa*. 33
CAMACHO, M., RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N., RIVAS, R., LEIDI, E.O., Y VELÁZQUEZ, E.

SI-8. Aislamiento y caracterización de una nueva especie del género *Rhizobium*. 34
GARCÍA-FRAILE, P., VELÁZQUEZ, E., MATEOS, P.F., MARTÍNEZ-MOLINA, E., Y RIVAS, R.

SI-9. Nodulación de *Cicer arietinum* por cepas de *Mesorhizobium amorphae* en suelos del Norte de España. 35
RIVAS, R., MATEOS, P. F., MARTÍNEZ-MOLINA, E., Y VELÁZQUEZ, E.

SI-10. *Sinorhizobium morelense* es una bacteria simbiótica inestable. 36
RAMÍREZ-BAHENA, M. H., LEMOS, A., Y WANG, E.T.

SI-11. *Paenibacillus cineris, P. cookii* y *P. wynnii*, tres nuevas especies fijadoras de nitrógeno atmosférico originarias de la Antártida. 37
RODRÍGUEZ-DÍAZ, M., LOGAN, N.A., Y RODELAS, B.

SI-12. Heterogeneidad de rizobios como bioindicador de efectos inducidos por plantas genéticamente modificadas en la rizosfera de *Arabidopsis thaliana*. 38
GARCIA-VILLARACO, A., LUCAS GARCÍA, J.A., BARRIUSO, J., Y PROBANZA, A.

SI-13. *Halomonas maura*, un microorganismo halófilo moderado que fija el nitrógeno atmosférico. 39
FERNÁNDEZ-CARAZO, R., ARGANDOÑA, M., LLAMAS, I., MARTÍNEZ-CHECA, F., CABA, J., QUESADA, E. Y DEL MORAL, A.

SI-14. Desarrollo de un modelo para la ecología y evolución de la relación *Rhizobium*-leguminosa. 40
MARCO, D., Y SANJUÁN, J.

Sesión II.
Genética, genómica y proteómica de los microorganismos diazotróficos y de plantas asociadas. *41*

SII-P1-P2. La era post-genoma: nuevas herramientas y estrategias para la investigación en Fijación de Nitrógeno. 43
IMPERIAL, J., SANJUÁN, J.

SII-1. Regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli*. 44
PÉREZ-MENDOZA, D., MUÑOZ, S., NOGALES, J., PANDO, V., SEPÚLVEDA, E., ROMERO, D., BROM, S., OLIVARES, J., HERRERA-CERVERA, J. A., Y SANJUÁN, J.

SII-2. Estudio *in vitro* e *in vivo* de la actividad relaxasa (TraA) del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli*; implicaciones evolutivas en plásmidos de la familia Rhizobiaceae. *45*
PÉREZ-MENDOZA, D., LUCAS, M., MUÑOZ, S., HERRERA-CERVERA, J. A., OLIVARES, J., DE LA CRUZ, F., Y SANJUÁN, J.

SII-3. Análisis del transcriptoma de *Sinorhizobium meliloti* en respuesta a choque osmótico. *46*
DOMÍNGUEZ-FERRERAS, A., PÉREZ-ARNEDO, R., BECKER, A., SOTO, M.J., OLIVARES, J., Y SANJUÁN, J.

SII-4. Importancia de la biosíntesis de trehalosa en la capacidad de osmoadaptación y eficiencia simbiótica de *S. meliloti*. *47*
PÉREZ-ARNEDO, R., DOMÍNGUEZ-FERRERAS, A., SOTO, M.J., OLIVARES, J., Y SANJUÁN, J.

SII-5. Caracterización del gen *pgi* en la simbiosis *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa. *48*
OLIVA-GARCÍA, J.J., VAN DILLEWIJN, P., SANJUÁN, J., OLIVARES, J., Y SOTO, M.J.

SII-6. Control coordinado de motilidad y propiedades simbióticas en *Sinorhizobium meliloti* mediado por VisNR. *49*
SOTO, M.J, SCHARF, B., SCHMITT, R., SANJUÁN, J., Y OLIVARES, J.

SII-7. Caracterización molecular y funcional de proteínas HupE en *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae. *50*
BRITO, B. , CABRERA, E., PALACIOS, J.M., IMPERIAL, J., Y RUIZ-ARGÜESO, T.

SII-8. Caracterización molecular de hidrogenasas en *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) y *Azorhizobium caulinodans*. *51*
BAGINSKY, C., IMPERIAL, J., RUIZ-ARGÜESO, T., PALACIOS, J.M., Y BRITO, B.

SII-9. Análisis funcional del operón *hupGHIJ* en la síntesis de la hidrogenasa por *R. leguminosarum* bv. viciae. *52*
MANYANI, H., REY, L., IMPERIAL, J., Y RUIZ-ARGÜESO, T.

SII-10. Los genes *motR* y *motS* controlan la motilidad y determinan la competitividad en *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae UPM791. *53*
MARTÍNEZ, M., CAPDEVILA, S., CABRERA, E., RUIZ-ARGÜESO, T. , E IMPERIAL, J.

SII-11. Análisis proteómico de *Rhizobium leguminosarum* bv viciae en respuesta a la regulación por "quorum sensing". *54*
CANTERO, L., MARUGÁN, V., PALACIOS, J.M. RUIZ-ARGÜESO, T., E IMPERIAL, J.

SII-12. El sistema Tat (Twin Arginine Translocation) de exportación de proteínas afecta a los estadíos vegetativo y simbiótico de *Rhizobium leguminosarum* bv viciae. *55*
REY, L., MELONI, S. , RUIZ-ARGÜESO, T., Y PALACIOS, J. M.

SII-13. Aspectos moleculares y fisiológicos de diferentes variedades de *Medicago truncatula* sometidas a estrés salino. *56*
DE LORENZO, L., MERCHÁN, F., CRESPI, M., MEGÍAS, M., Y SOUSA, C.

SII-14. Estudio del transcriptoma de *Medicago truncatula* en respuesta al estrés salino. *57*
MERCHÁN, F., DE LORENZO, L., FRUGIER, F., MEGÍAS, M. , SOUSA, C., Y CRESPI, M.

SII-15. Regulación de genes de quimiotaxis en *Rhizobium leguminosarum*. 58
DEL BEL, K.L., YOST, C.K., Y HYNES, M.F.
SII-16. Regulación de la desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*. 59
ROBLES, E. F., BONNARD, N., BUENO, E., MOLINERO, N., DELGADO, M.J., Y BEDMAR, E.J.
SII-17. Factores relacionados con el control de la expresión en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Z25 de una bacteriocina que guarda similitud con las toxinas de la familia RTX. 60
MORA, L., RODELAS, B., Y GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.
SII-18. Análisis funcional del tmRNA de *Sinorhizobium meliloti* en vida libre y en simbiosis. 61
LLORET, J., RIVILLA, R., Y WALKER, G. C.
SII-19. Factores sigma de función extracitoplasmática en *S. meliloti*: aproximación transcriptómica y proteómica. 62
ORUEZABAL, R.I., JOFRE, E., MORA, M., LLORET, J., BECKER, A., Y RIVILLA, R.
SII-20. Modificación de la expresión génica por niveles de B y Ca durante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas. 63
REDONDO-NIETO, M., BOLAÑOS, L, MERGAERT, P., MAUNOURY, N., KONDOROSI, E., Y BONILLA, I.
SII-21. Estudio transcriptómico de la respuesta de *Sinorhizobium meliloti* ante la presencia y actividad de retrointrones. 64
MOLINA-SÁNCHEZ, M.D., BARRIENTOS-DURÁN, A., MARTÍNEZ-ABARCA, F., RÜBERG, S., BECKER, A., Y TORO, N.
SII-22. Clonación y expresión del gen que codifica para trehalasa en *Medicago truncatula*. 65
HERRERA-CERVERA, J.A., LÓPEZ, M., TEJERA N.A., Y LLUCH, C.
SII-23. Del tubo polínico al cordón de infección: reclutamiento de los genes pécticos de polen de *Medicago* para la simbiosis. 66
EL MOUNADI, K., PÉREZ-HORMAECHE, J., DARY, M., CAVIEDES, M.A., RATET, P., PALOMARES, A.J., Y RODRÍGUEZ-LLORENTE, I.D.

Sesión III.
Reconocimiento e interacción planta-microorganismo:* Rhizobium-*leguminosa, micorrizas, actinorrizas, PGPRs. *67*

SIII-P1. Reconocimiento e integración funcional entre simbiontes en micorrizas arbusculares. 69
FERROL, N., BAREA, J.M., Y AZCÓN-AGUILAR, C.
SIII-P2. Caracteres bacterianos implicados en la colonización de la rizosfera. 70
MARTÍN, M., Y RIVILLA, R.
SIII-1. Relación causa/efecto entre mutación en genes simbióticos y resistencia a la micorrización y nodulación. 71
GARCÍA GARRIDO, J.M., HERRERA MEDINA, M.J., MORALES VELA, G., TAMAYO NAVARRETE, M.I., Y OCAMPO BOTE, J.A.

SIII-2. Efectos del B sobre glucoproteínas de la membrana peribacteroidea en simbiosomas de nódulos de leguminosas. *72*
BONILLA, I., REDONDO-NIETO, M., PULIDO, L., Y BOLAÑOS, L.

SIII-3. Interacciones planta-*Rhizobium* mediadas por glucoconjugados durante la infección del nódulo y el desarrollo de simbiosomas. *73*
BOLAÑOS, L., RIVILLA, R., REDONDO-NIETO, M., BREWIN, N. J., Y BONILLA, I.

SIII-4. ¿Son capaces determinados rizobios de inducir resistencia sistémica en *Arabidopsis thaliana*? *74*
RAMOS SOLANO, B., DOMÉNECH MANTECA, J., PEREYRA DE LA IGLESIA, M.T., MEGÍAS GUIJO, M., Y GUTIERREZ MAÑERO, F. J.

SIII-5. La acidez modifica los factores de nodulación liberados por *Rhizobium tropici* CIAT899.
MORÓN, B., SORIA-DÍAZ, M.A., VERROIOS, G., NOREEN, S., RODRÍGUEZ-NAVARRO, D.N., GIL-SERRANO, A., THOMAS-OATES, J., *75*
MEGÍAS, M., Y SOUSA, C.

SIII-6. Construcción de cepas híbridas de *Rhizobium* que nodulan en *Phaseolus vulgaris*: Estudio de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. *76*
GAMANE, D., CAMACHO, M., DARDANELLI, M.S., MEGÍAS, M., Y SOUSA, C.

SIII-7. Estudio de los sistemas PGPRs/rizobios que interaccionan con leguminosas. *77*
ESTÉVEZ, J., DARDANELLI, M.S., GARCÍA-TRIGUEROS, C., OLLERO, F.J., SOUSA, C., Y MEGÍAS, M.

SIII-8. Influencia del estrés salino sobre la expresión de los genes de nodulación y biosíntesis de las moléculas señal de *R. tropici* CIAT899. *78*
ESTÉVEZ, J., DARDANELLI, M.S., MORÓN, B., FERNÁNDEZ, F., SORIA-DÍAZ, M.E., THOMAS-OATES, J., GIL-SERRANO, A., SOUSA, C., Y MEGÍAS, M.

SIII-9. Estudio de la respuesta del sistema PGPR/Rizobia frente a exudados de judía. *79*
DARDANELLI, M., ESTÉVEZ, J., LÓPEZ BAENA, F., OJEDA, J., SOUSA, C., Y MEGÍAS, M.

SIII-10. Efectos de la interacción molecular entre PGPRs/ISR-rizobios: sideróforos, homoserina lactonas, proteínas de secreción, LPSs y otros componentes superficiales. *80*
ESPUNY, M.R., BELLOGÍN, R.A. , CUBO, T., DARDANELLI, M.S. , LÓPEZ-BAENA, F.J., MEGIAS, M. , Y OLLERO, F.J.

SIII-11. Estudios preliminares de colonización de raíces de *Phaseolus vulgaris* por diferentes microorganismos (Rizobios y PGPR´s). *81*
RODRÍGUEZ-NAVARRO, D. N., LÓPEZ BAENA, F. J., DARDANELLI, M. S., ALBAREDA CONTRERAS, M., Y MEGÍAS, M.

SIII-12. Caracterización de *Pseudomonas fluorescens* con propiedades PGP aisladas de la rizosfera de *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste). *82*
DONATE CORREA, J., PÉREZ GALDONA, R., Y LEÓN BARRIOS, M.

SIII-13. Efecto de *Pseudomonas* fluorescens $ACCd^{+}$ sobre *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste). *83*
DONATE CORREA, J., PÉREZ GALDONA, R., Y LEÓN BARRIOS, M.

SIII-14. Evaluación de las poblaciones indígenas de rizobios que nodulan con la soja en suelos de China. *84*
BUENDÍA-CLAVERÍA, A., BONILLA MANGAS, I., GUTIÉRREZ, R., HIDALGO, A., LUCENA MAROTTA, J.J., PARADA, M., RODRÍGUEZ NAVARRO, D.N., TEMPRANO, F., VINARDELL, J.M., YANG, S. S., Y ZHOU, J.C.

SIII-15. Diseño de un sistema de doble raíz no destructivo para los estudios de nodulación de *Sinorhizobium fredii* con la soja. *85*
HIDALGO, A., BUENDÍA-CLAVERÍA, A., GUTIÉRREZ, R., PARADA, M., VINARDELL, J.M., Y RUIZ-SAINZ, J.E.

SIII-16. Estudios de competitividad y de bloqueo en la simbiosis *Sinorhizobium fredii*-soja usando un sistema de doble raíz. *86*
VINARDELL, J.M., BUENDÍA-CLAVERÍA, A., GUTIERREZ, R., HIDALGO, A., PARADA, M., Y RUIZ-SAINZ, J.E.

SIII-17. Identificación de genes de *Sinorhizobium fredii* implicados en la biosíntesis de KPS y estudio de su papel en la simbiosis con diversas leguminosas. *87*
PARADA, M., VINARDELL, J.M., OLLERO, F.J., LEI, W., HIDALGO, A., BUENDÍA-CLAVERÍA, A.M., GUTIÉRREZ, R., Y RUIZ SAINZ, J.E.

SIII-18. Genes regulados por *quorum sensing* y rizosfera en *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *88*
SÁNCHEZ-CONTRERAS, M., RODELAS, B., Y DOWNIE, A. J.

SIII-19.Producción de moléculas señal en *Bradyrhizobium japonicum*. *89*
NAVASCUÉS ORTEGA, B., LORITE, M.J., SÁNCHEZ RAYA, J., VÍLCHEZ, R., Y BEDMAR, E.J.

SIII-20. Implicación del transportador de molibdeno ModABC de *Bradyrhizobium japonicum* en la fijación simbiótica de nitrógeno. *90*
TALBI, C., TRESIERRA-AYALA, A., MOLINERO, N., BEDMAR, E. J., Y DELGADO, M. J.

SIII-21. Análisis de la secuencia del gen *celC2* de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843. *91*
MATEOS, P., ZURDO-PIÑEIRO, J.L., JIMÉNEZ-ZURDO, J.I., RAMÍREZ-BAHENA, M.H., VELÁZQUEZ, E., TRUJILLO, M., Y MARTÍNEZ-MOLINA, E.

SIII-22. Identificación y caracterización de genes inducidos tempranamente en la simbiosis *Mesorhizobium loti-Lotus japonicus*. *92*
MATAMOROS, M., PITZSCHKE, A., Y PARNISKE, M.

SIII-23. Interacción *Rhizobium*-micorriza en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* en condiciones de salinidad. *93*
IRIBARNE, C., OLIVERA, M., TEJERA, N., Y LLUCH, C.

SIII-24. El tratamiento de raices y semillas con factores Nod induce un mayor numero de nodulos en plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con una poblacion limitante de *Sinorhizobium meliloti*. *94*
BRELLES MARIÑO, G.

Sesión IV.
Fisiología de la fijación de nitrógeno y asimilación. ***95***

SIV-P1. Enzimas y genes implicados en el metabolismo de los ureidos y las amidas en leguminosas. *97*
PINEDA, M., PIEDRAS, P., Y AGUILAR, M.

SIV-P2. Fisiología de la fijación de nitrógeno en leguminosas: ¿qué sabemos realmente? *98*
ARRESE-IGOR, C., GONZÁLEZ, E.M., MORAN, J.F., GÁLVEZ, L., MARINO, D., LADRERA, R., DENIA, E.

SIV-1. Efecto del estrés oxidativo sobre la actividad ICDH en nódulos de guisante. *99*
MARINO, D., DENIA, E., GÁLVEZ, L., GONZÁLEZ, E.M., Y ARRESE-IGOR, C.

SIV-2. Efecto de la disponibilidad de fosfato sobre la respuesta de *Phaseolus vulgaris* a la salinidad. *100*
OLIVERA, M., OCAÑA, A., TEJERA, N., HERRERA-CERVERA, J.A., Y LLUCH, C.

SIV-3. Actividad trehalasa y metabolismo carbonado en nódulos de *Medicago truncatula* bajo condiciones de estrés salino. *101*
LÓPEZ, M., HERRERA-CERVERA, J.A., IRIBARNE, C., OCAÑA, A., Y LLUCH, C.

SIV-4. Fosfatasa ácida no específica en hojas y nódulos radicales de judía: purificación parcial y caracterización. *102*
OCAÑA, A., OLIVERA, M., TEJERA, N., IRIBARNE, C., Y LLUCH, C.

SIV-5. Purificación y caracterización de la enzima trehalasa nodular de *Phaseolus vulgaris*. *103*
TEJERA, N., IRIBARNE, C., LÓPEZ, M., HERRERA-CERVERA, J.A., Y LLUCH, C.

SIV-6. Implicación del enzima aldehído oxidasa en la morfogénesis de los nódulos de leguminosas. *104*
FEDOROVA, E.E., REDONDO, F.J., KOSHIBA, T., PUEYO, J.J., DE FELIPE, M.R., Y LUCAS, M.M.

SIV-7. Respuesta de defensa inducida en nódulos de altramuz formados por una cepa incompatible de *Mesorhizobium loti*. *105*
FEDOROVA, E.E., PUEYO, J.J., DE FELIPE, M.R., Y LUCAS, M.M.

SIV-8. Estructura y expresión diferencial de una posible porina de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) en vida libre y en simbiosis inducida por glifosato. *106*
DE MARÍA, N., GUEVARA, M. A., GONZÁLEZ-SAMA, A., DE FELIPE, M.R., SERRA, M.T., GARCÍA-LUQUE, I., Y FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.

SIV-9. Protección frente a estrés oxidativo mediante expresión de la proteína antioxidante flavodoxina en *Sinorhizobium meliloti*. *107*
REDONDO, F.J., LUCAS, M.M., Y PUEYO, J.J.

SIV-10. Estructura-función de la senescencia de nódulos de soja. *108*
SOUSSI, M., FRENDO, P., DE FELIPE, M.R., Y LUCAS, M.M.

SIV-11. Identificación y posible función de receptores de citoquininas en nódulos simbióticos de leguminosas. *109*
COBA DE LA PEÑA, T., FEDOROVA, E.E., LUCAS, M.M., Y PUEYO, J.J.

SIV-12. Efecto del Cadmio sobre el metabolismo de tioles en leguminosas. *110*
RAMOS, J., CLEMENTE, M.R., PÉREZ-RONTOMÉ, C., LOSCOS, J., NAYA, L., MATAMOROS, M.A., Y BECANA, M.

SIV-13. Expresión de genes antioxidantes en nódulos de alfalfa en condiciones de estrés hídrico. *111*
NAYA, L., RAMOS, J., Y BECANA, M.

SIV-14. Localización de superóxido dismutasas y peróxido de hidrógeno en nódulos de alfalfa y guisante. *112*
CLEMENTE, M.R., RUBIO, M.C., JAMES, E.K., BUCCIARELLI, B., VANCE, C.P., Y BECANA, M.
SIV-15. Inmunohistolocalización y expresión de superóxido dismutasas durante el desarrollo del nódulo en *Lotus japonicus*. *113*
RUBIO, M.C., BECANA, M., Y SPAINK, H.P.

Sesión V.
Aplicaciones en agricultura y medio ambiente. ***115***

SV-P1. Aplicación de microorganismos beneficiosos en Agricultura y Medioambiente. *117*
RODRÍGUEZ NAVARRO, D.N.
SV-P2. Toxicidade dos metais pesados na simbiose *Rhizobium*-leguminosa em solos poluídos. *118*
CASTRO, I.V. Y FERREIRA, E.
SV-1. Characterization of rhizobia natural populations nodulating *Lotus corniculatus* from polluted soils. *119*
CASTRO, I. V.
SV-2. Nitrogen fixation characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in soil amended with sewage sludge. *120*
FERREIRA, E., Y CASTRO, I.V.
SV-3. Localización y distribución de Cd en plantas noduladas de altramuz. *121*
ZORNOZA, P., VÁZQUEZ, S., ESTEBAN, E., FERNÁNDEZ-PASCUAL, M., Y CARPENA, R.O.
SV-4. La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa como herramienta para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. *122*
PAJUELO, E., CARRASCO, J. A., ARMARIO, P., ZACCHI, L., CAVIEDES, M.A., CHAMBER, M.A. , Y PALOMARES, A.J.
SV-5. Análisis fitorremediador de leguminosas silvestres de la cuenca del rio Guadiamar. *123*
ARMARIO, P., CARRASCO, J.A., PAJUELO, E., PALOMARES, A.J., Y CHAMBER, M.A.
SV-6. Evaluación de la idoneidad de sustratos para la elaboración de inoculantes microbianos. *124*
TEMPRANO, F.J., Y ALBAREDA, M.
SV-7. Fijación de N_2 en los arrozales del Delta del Ebro. *125*
DEL CUETO, A., ABURTO, J., MARTÍN, D., NUÑEZ, F. J., QUESADA, A., Y FERNÁNDEZ VALIENTE, E.
SV-8.Construcción de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* para rizorremediación de PCBs, utilizando sistemas de regulación nod. *126*
VILLACIEROS, M., SÁNCHEZ-CONTRERAS, M., MARTÍN, M., AGUIRRE DE CÁRCER, D., DOWLING, D., KARLSON, U., MACKOVA, M., Y RIVILLA, R.
SV-9. Desarrollo de nuevos inoculantes de *Rhizobium* por incorporación del sistema de oxidación de hidrógeno. *127*
URETA, A.C., MUÑOZ, S., IMPERIAL, J., RUIZ-ARGÜESO, T., SANJUAN, J., Y PALACIOS, J.M.

SV-10. TGGE aplicado al estudio de la biodiversidad de bacterias desnitrificantes y oxidadoras de amonio en biopelículas de filtros sumergidos para el tratamiento de aguas residuales urbanas. *128*
GÓMEZ VILLALBA, B., CALVO, C., RODELAS, B., Y GONZÁLEZ-LÓPEZ, J.
SV-11. Efecto de la interacción entre CO_2, temperatura y sequía en la actividad nodular de plantas de alfalfa. *129*
ARANJUELO, I., ERICE, G., IRIGOYEN, J.J., Y SÁNCHEZ-DÍAZ M.
SV-12. Previous studies on the effects of combined inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium hedisari* on Sulla (*Hedysarum coronarium* L). *130*
BARBERA, A.C., LLUCH, C., Y FISCELLA, T.
SV-13. Mejora de la tolerancia de *Rhizobium etli* a salinidad y su efecto sobre la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. *131*
DOMÍNGUEZ-FERRERAS, A., TEJERA, N.A., HERRERA-CERVERA, J.A., SOTO, M.J., OLIVARES, J., LLUCH, C., Y SANJUÁN, J.
SV-14. Cometabolismo diazotrófico de compuestos nitroaromáticos en la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhodobacter capsulatus* B10. *132*
PÉREZ-REINADO, E., BLASCO, R., MORENO-VIVIÁN, C., CASTILLO, F., Y ROLDÁN, M.D.
SV-15. Incremento en la supervivencia de *Pseudomonas putida* KT2440. *133*
MUÑOZ-ROJAS, J., Y RAMOS, J.L.

Sesión VI.
Nuevos Confines
de la Fijación Biológica de Nitrógeno.
135

SVI-P1. Fijación de N_2 en la Antártida.
FERNÁNDEZ VALIENTE, E., QUESADA, A., RICO, E., Y CAMACHO, A. *137*
SVI-P2. El regulón *nif* en un aislado ambiental de la bacteria acidófila *Leptospirillum ferrooxidans*: conexión con otras funciones metabólicas. *138*
PARRO, V., Y MORENO PAZ, M.

Índice de autores ***139***

Índice de asistentes a la Reunión ***145***

Presentación.

La Universidad de Granada y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas se congratulan de organizar la *X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno*, y muestran su agradecimiento a la Asamblea General de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), celebrada en Córdoba en febrero de 2002, por la encomienda de dicha organización, así como a todos los participantes que han contribuído a llevar a cabo esta celebración.

La fundación de la Universidad de Granada data de 1531, bajo el refrendo del Papa Clemente VII, y se establece en el Renacimiento con el espíritu de defender la cristiandad de su fundador Carlos V, aunque recibe la carga medieval de las viejas universidades europeas, a cuya organización queda asimilada. Hoy, a los albores de cinco siglos, la institución acoge este evento ya en el marco de una Europa unida a nivel educativo, económico y social.

En las últimas décadas, entre los numerosos retos abiertos por la comunidad científica hay dos objetivos que interesan en particular a nuestro colectivo: el aumento de la producción agrícola y de alimentos que demanda el incremento de población, y la conservación del medio ambiente, preservándolo del proceso creciente de degradación. Se ha establecido que la fijación biológica de nitrógeno puede contribuir a la productividad de sistemas naturales y agronómicos en áreas tanto de leguminosas como de no leguminosas, y que el estímulo de esta investigación debe ser potenciado.

Sin embargo, en el nuevo milenio las herramientas moleculares y los avances de la investigación científica han posibilitado que en torno a la fijación biológica de nitrógeno exista un foro interdisciplinar en donde coexisten biología molecular, genética, bioquímica, fisiología, agronomía y ecología, coexionando a un grupo de entusiatas y dinámicos investigadores nacionales con impacto y reconocimiento a nivel internacional.

Los objetivos de las Reuniones científicas son ciertamente diversos. Actualizar información, poner en contacto directo a distintos investigadores, y cómo no, crear un espíritu de compañerismo y amistad entre los asistentes. Además, en nuestro caso las Reuniones Nacionales de la SEFIN siempre han mostrado un especial interés en tutelar la integración de jóvenes investigadores a esta área del conocimiento científico. Es por ello que en esta Reunión a celebrar en Granada hemos tratado de implicar a estas promesas de la investigación en el desarrollo de las distintas actividades que tendrán lugar los próximos días 15 al 18 de Junio de 2004, con el objetivo de resaltar la importancia que para el futuro de la investigación en fijación biológica de nitrógeno representa la existencia de una sólida generación de nuevos científicos.

Granada, la ciudad universitaria, la ciudad del embrujo, la ciudad del agua, nos acoge en el tránsito de la primavera al verano. Esperamos que como en el poema de Francisco Villaespesa se nos meta en las venas.

La sangre de Granada corre por esas fuentes,
y en el hondo misterio de las noches serenas,
al escuchar sus músicas, sobre los viejos puentes,
la sentimos también que corre por nuestras venas.

Bienvenidos a Granada.

Jesús González López y Carmen Lluch Plá
Presidentes del Comité Organizador.

20 años de historia de la SEFIN.

La Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN) es una Sociedad de ámbito nacional que fue aprobada por la Dirección General de Política Interior con fecha de 26 de diciembre de 1983 y figura inscrita en el registro de Asociaciones del Gobierno Civil de Salamanca con el número 581. Desde entonces la SEFIN ha madurado como Sociedad Científica y para conmemorar los 20 años de su andadura se van a celebrar este año dos acontecimientos relevantes. Uno es la celebración en Granada de la X Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno, y el otro es su ingreso en la Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE) de reciente fundación.

Como antecedente más inmediato a la fundación de la SEFIN, se celebró la I Reunión Nacional de Fijación de Nitrógeno, organizada por la Unidad de Fijación de Nitrógeno del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Salamanca, entre los días 8 y 10 de junio de 1983. La iniciativa de la organización de esta Reunión partió de un Comité Organizador encabezado por el Dr. Claudino Rodríguez Barrueco como Presidente. Esta Reunión supuso el primer contacto a nivel nacional de especialistas e interesados en el sugestivo tema de la Fijación de Nitrógeno Atmosférico. Un objetivo primordial de la I Reunión fue inventariar la investigación realizada en España sobre la especialidad, cubriendo aspectos fisiológicos, bioquímicos, microbiológicos, agrícolas, industriales y ecológicos, de los sistemas libres o asociados que realizan dicha función, así como los efectos sobre la misma de otros factores como clima, plaguicidas, etc. En esta I Reunión se presentaron los Estatutos de funcionamiento de la nueva Sociedad, que fueron elaborados por una Comisión Gestora formada por los Doctores Claudino Rodríguez Barrueco como Presidente, Tomás Ruiz Argüeso como Secretario, Francisco Bermúdez de Castro y Naya como Tesorero, José Olivares Pascual y Rafael Orive Echevarría como Vocales.

Los objetivos de la SEFIN, que vienen reflejados en sus Estatutos, se pueden resumir en: promover el desarrollo de la Fijación de Nitrógeno en España en todas sus ramas y actividades; promocionar la organización de Reuniones Científicas y de cualquier otro medio que sirva para establecer y mantener un contacto entre todos aquellos que estén interesados en el tema; promover la visita a España de científicos extranjeros de prestigio relevante en el campo de la especialidad, así como establecer relaciones con otras Sociedades de la especialidad de otros países y de ciencias afines en España siempre que ello pueda contribuir eficazmente al desarrollo de la Fijación de Nitrógeno y al de la labor científica de sus asociados.

En la actualidad, la SEFIN cuenta con más de un centenar de socios, especializados principalmente en los campos de la Microbiología, Fisiología Vegetal, Química, Bioquímica e Ingeniería Agronómica, que forman parte de una treintena de Grupos de Investigación activos, tanto vinculados al Consejo Superior de Investigaciones Científicas como a Universidades públicas y privadas de todas las Comunidades Autónomas españolas. También forman parte de la SEFIN investigadores del CIFA Las Torres-Tomejil gestionado por la Junta de Andalucía (Sevilla) y del Servicio de Investigación, Desarrollo y Tecnología Agraria de la Junta de Castilla y León (Valladolid).

La actividad de la SEFIN en sus veinte años de andadura se ha reflejado en las sucesivas Reuniones Nacionales que se han venido celebrando aproximadamente cada dos años, además del patrocinio de otras actividades como Redes, Cursos o Proyectos. La I Reunión fue organizada por el Dr. Claudino Rodríguez Barrueco en Salamanca, la II Reunión se celebró en Granada organizada por el Dr. José Olivares Pascual, la III Reunión fue organizada por el Dr. Manuel Sánchez Díaz en Pamplona, la IV Reunión se celebró en Sevilla organizada por el Dr. Antonio Palomares Díaz, la V Reunión fue organizada por el Dr. Tomás Ruiz-Argüeso en Madrid, la VI tuvo lugar en Santa Cruz de Tenerife organizada por el Dr. Ángel Gutiérrez Navarro, la VII fue organizada por el

Dr. Eustoquio Martínez Molina en Salamanca, la VIII se celebró en Pamplona organizada por el Dr. César Arrese-Igor, y la IX se celebró en Córdoba organizada por el Dr. Francisco Castillo Rodríguez. La organización de la X Reunión se ha encomendado a los Dres. Carmen Lluch Plá, Jesús González López y Eulogio Bedmar Gómez, y se celebrará en Granada del 15 al 18 de Junio de 2004. Además, la SEFIN colaboró activamente en la organización de First US-Spain Program Development Workshop on Nitrogen Fixation, organizado en Granada por el Dr. Tomás Ruiz Argüeso en 1985, y en la V European Nitrogen Fixation Conference, organizada por los Dres. Antonio Palomares y José Olivares en Sevilla en el año 2000.

La incorporación de España a las nuevas estructuras internacionales ha determinado una transformación de la sociedad que se prevé fragüe en una nueva realidad social, uno de cuyos elementos fundamentales es el papel que va a desempeñar el conocimiento científico y el desarrollo tecnológico. La comunidad científica española ha decidido contribuir a esta tarea mediante sus sociedades científicas representativas. La COSCE reúne actualmente cerca de 50 Sociedades Científicas nacionales que incluyen a mas de 20.000 investigadores; sus objetivos persiguen esencialmente a) contribuir al desarrollo científico y tecnológico de nuestro país, b) actuar como interlocutor cualificado, tanto de la propia sociedad civil como de sus poderes públicos representativos y c) promover el papel de la Ciencia y contribuir a su difusión como un ingrediente necesario de la cultura.

Tomás Ruiz Argüeso,
Presidente de la SEFIN.

Conferencias Plenarias.

C-1

Ecología evolutiva de la diazotrofía y de la nodulación.

Rosenblueth, M., Vinuesa, P., Silva, C., Lloret, L., Ormeño, E., Martínez, L., Torres, C., Martínez, J., Rogel, M.A., Toledo, I., Hernández, I., y Martínez-Romero, E.*

Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Apdo. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, México.
**emartine@cifn.unam.mx*

La fijación de nitrógeno (diazotrofía) es un proceso exclusivo de procariontes. Además de Arqueas, sólo 6 de las aproximadamente 53 phyla o linajes de Bacteria cuentan con especies fijadoras de nitrógeno. Este recuento corresponde a los diazótrofos que han sido cultivados, seguramente también existen en phyla de no cultivables o entre los que sólo se han podido cultivar recientemente. Los fijadores de N tienen una ventaja adaptativa cuando el carbono no es limitante pero el nitrógeno sí, de ahí que exista una tendencia natural de las plantas a asociarse con fijadores de nitrógeno los cuales promueven su crecimiento. Al analizar estas poblaciones, aisladas de plantas de interés agrícola, descubrimos que algunas de estas bacterias no sólo se encuentran en plantas sino también se aislan de pacientes en hospitales. Comparamos las cepas clínicas y de plantas de *Klebsiella* utilizando marcadores moleculares que se encuentran distribuídos en los cromosomas de enterobacterias. Las reconstrucciones filogenéticas revelaron un grupo claramente definido, cercano a *Klebsiella pneumoniae* pero aislado genéticamente de ésta, al que denominamos *K. variicola*. Mientras el 100% de las cepas de *K. variicola* (tanto de plantas como clínicas) son fijadoras de nitrógeno, solo el 10% de *K. pneumoniae* lo fueron. Pensamos que éstas últimas están mejor adaptadas al humano y que se ha contraseleccionado la capacidad de fijar nitrógeno al no requerirse. No recomendamos el uso de cepas de *K. variicola* como inoculante en la agricultura.

Durante más de 100 años los rizobios se han utilizado en la agricultura, en muchas ocasiones con resultados favorables. La nodulación parece ser un proceso más reciente que la fijación de nitrógeno y se limita a dos phyla de Bacteria. En general no se han encontrado rizobios en pacientes humanos, aunque sí se han encontrado *Agrobacterium*, así que se considera que los rizobios son seguros y pueden utilizarse para desplazar a cepas potencialmente patógenas de las plantas. A pesar de que los rizobios son de los grupos más estudiados, se piensa que aún no se conoce toda su diversidad. El análisis de secuencias de genes metabólicos, simbióticos e informativos con nuevos métodos de reconstrucción filogenética permiten definir claramente los linajes evolutivos de estas bacterias y reconocer eventos de recombinación y migración bacterianos. Así estamos definiendo las filogenias moleculares de *Rhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium*. Hemos identificado nuevas especies que nodulan *Phaseolus lunatus*, los árboles nativos de *Acacia* en México y leguminosas de la familia *Genisteae*, en este último caso, encontramos evidencia de transferencia lateral de información simbiótica entre especies.

Algunas de las bacterias que hemos obtenido de los estudios de diversidad, están siendo empleadas como inoculantes en trabajos de restauración ecológica en los que estamos sembrando acacias y otros árboles de leguminosas en una región talada y erosionada de México.

C-2

Control of root nodule organogenesis in *Medicago truncatula*

Kondorosi, A.*, Vinardell, J.M., Complainville, A., Maunoury, N., Nikovics, K., Campalans, A., Tarayre, S., d'Erfurth, I., Kevei, Z., Vaubert, D., Brocard, L., Trinh, H., Ratet, P., Mergaert, P., Crespi, M., y Kondorosi, E.

Institut des Sciences du Végétal CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

Under nitrogen-limited conditions, rhizobia induce the formation of a new organ, the nitrogen-fixing nodule on the roots of leguminous host plants. Nodule organogenesis is a result of a molecular dialogue between the plant and rhizobia. First, flavonoids exuded by the host plant roots turn on the nodulation genes in the microsymbionts. Then, the lipochito-oligosaccharide Nod factors produced induce the expression of the early nodulin genes, leading to the activation of the cell cycle in the nodulation sensitive root zone where nodule organogenesis starts. In *Medicago* roots, the G0-arrested cortical cells dedifferentiate and reenter the cell cycle in front of the protoxylem poles. We showed that the *enod40* gene coding for a sORF-RNA is required for nodule initiation where it is involved in the export of a nuclear RNA-binding protein into the cytoplasm [1]. Nodule oranogenesis is controled by long-distance signaling and carbon allocation. We demonstrated that nodule initiation induced symplasmic continuity between the phloem and nodule initials [3]. After several cycles [7], cell division is arrested and many cells undergo differentiation, endoreduplication and enlargement, leading to the establishment of nitrogen-fixing symbiosis. Numerous genes are expressed during the different developmental stages. We are particularly interested in studying those, which control a subset of genes, allowing dissection of organ development. As an example, *ccs52*, an activator of the Anaphase-Promoting Complex (APC) E3 ubiquitin ligase [2] is a novel regulator of cell cycle switch, which controls endoreduplication and nodule differentiation [8, 9]. In addition, a nodule-specific gene family encoding glycine-rich proteins [5] and another very large nodule-specific gene family (NCR) coding for small polypeptides with conserved cysteine motifs [6] were identified, that might be required for different stages of symbiotic cell development. Finally, to obtain knock out mutants of *M. truncatula*, an efficient insertional mutagenesis using the retrotransposon *Tnt1* has been developed [4].

[1] Campalans, A. et al. (2004). *Plant Cell*, in press.
[2] Cebolla, A. et al. (1999) *EMBO J.* 18, 4476-4484.
[3] Complainville, A. et al. (2003) *Plant Cell*, 15, 2778-2791.
[4] d'Erfurth, I. et al. (2003) *Plant J.*, 34, 95-106.
[5] Kevei, Z. et al. (2002) *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 15, 922-931.
[6] Mergaert, P. et al. (2003). *Plant Physiol.*, 132, 161-173.
[7] Roudier, F. et al. (2003) *Plant Physiol.* 131, 1091-1103.
[8] Tarayre, S, et al. (2004) *Plant Cell*, 16, 422-434.
[9] Vinardell, J.M. et al. (2003) *Plant Cell*, 15, 2093-2105. Editors' Choice Article in Science (2003) 301, 1815.10.

Sesión I.

Ecología, diversidad y evolución de los microorganismos diazotróficos

SI-P1

Diversidad de microorganismos fijadores simbióticos de nitrógeno.

Martínez-Molina, E.*, Mateos, P.F., Velazquez, E., Trujillo, M., y Rivas, R.

Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, 37005 Salamanca.
**emm@usal.es*

El estudio de los rizobios se inició en 1888 por Beijerinck que cultivó por primera vez bacterias aisladas de un nódulo radical. Un año más tarde, Frank, agrupó a estos microorganismos en un género con una sola especie, *Rhizobium leguminosarum*. La taxonomía de estas bacterias fue revisada en 1929 por Baldwin y Fred, que propusieron seis especies dentro del género *Rhizobium*: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*. Esta clasificación taxonómica de los rhizobia se realizó sobre la base del concepto de "grupos de inoculación cruzada".

Esta situación se mantuvo hasta el trabajo publicado por Wilson en 1944 sobre la especificidad en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. En este trabajo se concluyó que el establecimiento de grupos de inoculación cruzada, si bien puede tener utilidad práctica, debía abandonarse desde el punto de vista científico. Sin embargo, a pesar de estos resultados, la taxonomía actual mantiene parcialmente este criterio de clasificación.

Como consecuencia no se describieron nuevas especies y la taxonomía del grupo no experimentó más cambios hasta 1982.

El reconocimiento de las limitaciones del empleo de "los grupos de inoculación cruzada" como un criterio taxonómico, hizo que muchos autores comenzaran a emplear otros criterios y desarrollar nuevas técnicas para clasificar estos microorganismos.

La nueva taxonomía del grupo debe seguir los criterios de la taxonomía polifásica que integra datos fenotípicos, genómicos y filogenéticos. Este hecho, junto con el estudio de nuevos rizobios, aislados de leguminosas no estudiadas previamente y de diversas zonas geográficas del planeta, ha conducido a cambios muy profundos en la taxonomía de este grupo de bacterias en las dos últimas décadas.

Actualmente sabemos que los Microorganismos Fijadores Simbióticos de Nitrógeno que se asocian con leguminosas, no forman, en absoluto, un grupo homogéneo de microorganismos.

La mayoría de estos microorganismos se han agrupado en el orden *Rhizobiales* dentro de las α proteobacterias. En la actualidad se han descrito más de 40 especies pertenecientes a 8 Géneros distribuidos en 4 Familias distintas. Además la situación se ha hecho aún más compleja y atractiva puesto que en los ultimos años se han descrito Microorganismos Fijadores Simbióticos de Nitrógeno que se asocian con leguminosas, y que pertenecen a las β proteobacterias.

El interés de los investigadores en el análisis de la biodiversidad, en las ultimas decadas ha aumentado notablemente, por la importancia y el valor de la diversidad biológica en los procesos ecológicos y no sólo por sus aplicaciones en biotecnología agrícola.

SI-P2

Los rizobios que nodulan con la soja en suelos de China.

Ruiz-Sainz, J.E.[1]*, Bellogín, R.[1], Bonilla, I.[2], Camacho, M.[3], Hidalgo, A.[1], Lucena, J.J.[4], Noreen, S.[5], Schlaman, H.[6], Thomas-Oates, J.E.[5], Yang, S.S.[7], y Zhou, J.C.[8]

[1]Departamento de Microbiología Facultad de Biología, U. de Sevilla. Apdo 1095. 41080-Sevilla. España, [2]Departamento de Biología, [4]Departamento de Química Agrícola. U. Autónoma de Madrid. Cantoblanco M-28049. Madrid. España, [4]Departamento de Suelos y Riego, CIFA las Torres y Tomejil, Apartado de Correos Oficial, 41200-Alcalá del Río, Sevilla, España, [5]Department of Chemistry, U. of York, Heslington, York, YO10 5DD, UK, [6]Institute of Biology, Leiden University, Clusius Laboratory, Wassenaarseweg 64, 2333 AL Leiden, The Netherlands, [7]Department of Microbiology, China Agricultural University, 2 Yuan Ming Yuan West Road, 100094 Beijing, People´s Republic of China, [8]Department of Microbiology, Huazhong Agricultural University, Shi Zi Shan Street, PO Box 430070, Wuhan, People´s Republic of China.

China, el origen geográfico de la soja, es también el lugar donde se inició el cultivo de esta leguminosa hace más de cinco mil años. Dadas las enormes diferencias climáticas que se pueden encontrar en China, es lógico que exista una gran variedad de cultivares de soja adaptados a cada región (el número de germoplasmas chinos excede los 23.000). Todos estos hechos implican que China es el lugar apropiado para analizar las poblaciones de rizobios que nodulan con esta leguminosa, ya que simbiontes han podido co-evolucionar durante un tiempo suficiente. De esta forma se entiende que bacterias pertenecientes a géneros diferentes (*Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*) formen simbiosis con la soja.

Como resultado de dos proyectos financiados por la Unión Europea se ha analizado la presencia de las poblaciones nativas de rizobios de la soja en 15 provincias de China. En la gran mayoría de las zonas analizadas se han encontrado altas poblaciones de rizobios de la soja, tanto pertenecientes a *Bradyrhizobium* (crecimiento lento) como a *Sinorhizobium* (crecimiento rápido). Se han estudiado diversas características fisiológicas, genéticas y simbióticas de más de 200 estirpes de *Sinorhizobium fredii* y se ha construido un catálogo (www.soybeanrhizobia.net). Las características más útiles para distinguir entre estirpes diferentes fueron los análisis por PCR (RAPD) y los perfiles de plásmidos. En la actualidad se está realizando un análisis de los bioelementos de muestras de suelos chinos. Se han detectado niveles tóxicos de algunos elementos (como Pb), así como la presencia de lantánidos a alta concentración.

Hasta ahora, los factores de nodulación de los diversos rizobios que nodulan con la soja son prácticamente iguales, lo que indica una posible transferencia horizontal de los genes de nodulación. Los rizobios de la soja presentan genes ortólogos no funcionales del gen *nolO* de *Rhizobium sp*. NGR234, lo que concuerda con el hecho de que los factores de nodulación producidos por *Bradyrhizobium japonicum* y *Sinorhizobium fredii* carezcan de sustituciones carbamoílo. Curiosamente, en las estirpes analizadas de *S. fredii* la mutación del gen *nolO* afecta al mismo nucleótido, independientemente del origen geográfico de donde se haya aislado la bacteria.

Mesorhizobium tianshanense, *S. fredii* y *S. xinjiangense* no responden de forma igual a la presencia de diversos flavonoides inductores de los genes de nodulación. Si estas diferencias se dieran también en condiciones reales de campo podrían tener, tal vez, una influencia en la capacidad competitiva de los diferentes rizobios de la soja.

Estas investigaciones han sido financiadas por la UE, proyecto ICA4-CT-2001-10056.

SI-1

Biodiversidad y análisis taxonómico de cepas del actinomiceto *Frankia*

Igual, J.M.[1]*, Valverde, A.[1], Santa Regina, I.[1], Trujillo, M.[2], Velázquez, E.[2], y Rodríguez-Barrueco, C.[1]

[1]Departamento de Producción Vegetal. IRNA-CSIC. C/ Cordel de Merinas, 40-52; 37008 Salamanca. [2]Departamento de Microbiología y Genética. Edificio Departamental de Biología. Lab. 209. Universidad de Salamanca. Salamanca.
**igual@usal.es*

El actinomiceto *Frankia* induce la formación de estructuras nodulares fijadoras de nitrógeno en al menos 200 especies de plantas leñosas, encuadradas en 24 géneros y 8 familias, conocidas como plantas actinorrícicas (1). El estudio de *Frankia*, y de la biología de esta simbiosis, resulta difícil debido a la imposibilidad de aislar el microsimbionte de muchas de las especies actinorrícicas y, cuando ello es factible, al lento crecimiento de este actinomiceto *in vitro*. Por tanto, los trabajos sobre la taxonomía, ecología y biodiversidad de *Frankia* deben apoyarse casi exclusivamente en técnicas que no requieran el aislamiento previo y/o la obtención de una estimable biomasa del microorganismo. Así, las técnicas de biología molecular, en especial las basadas en PCR, están abriendo nuevos horizontes en esta clase de estudios dentro del género *Frankia* (3). En la actualidad se dispone de "primers" específicos, tanto del género como para algunos de los subgrupos en él conocidos. Ello permite el análisis de las poblaciones del endosimbionte a partir del ADN extraído directamente de los nódulos.

La biodiversidad de *Frankia* es uno de sus aspectos más destacables. *Frankia* muestra una gran biodiversidad, que se manifiesta incluso dentro de la misma especie hospedadora en un área geográfica muy reducida. Hasta la fecha, no se ha realizado ningún estudio sobre el tema en la Península Ibérica. En el presente trabajo se presentan datos de la diversidad genética de las poblaciones de *Frankia* que nodulan el aliso (*Alnus glutinosa* L.) en la ribera del río Tormes a su paso por la provincia de Salamanca, así como de las cepas de la colección de *Frankia* existente en el IRNASA-CSIC (Salamanca). Para ello se ha realizado la secuenciación parcial del gen 16S rARN mediante la utilización de dos "primers" específicos del género *Frankia* diseñados en nuestro laboratorio (4), así como de la secuencia intergénica 16S-23S rADN y de la secuencia parcial del gen *gln*II (2).

[1]Baker, D.D. and Schwintzer, C.R. (1990). Introduction, p. 3-13. *In* C. R. Schwintzer and J. D. Tjepkema (ed), The Biology of Frankia and Actinorhizal Plants. Academic Press, Inc., New York

[2]Hahn, D. *et al.* (1999). Assesing Frankia populations in plants and soil using molecular methods. FEMS Microb. Lett. 29: 215-227

[3]Igual, J.M., *et al.* (2003a) Genomic fingerprinting of *Frankia* strains by PCR-based techniques. Assessment of a primer based on the sequence of 16S rRNA gene of *Escherichia coli*. Plant Soil 254: 115-223

[4]Igual, J.M. *et al.* (2003b). Identificación de cepas de *Frankia* utilizando secuenciación específica de un fragmento del gen ribosómico 16S y perfiles de LMW RNA. XIX Congreso Nacional de Microbiología. SEM. pp. 19

SI-2

Análisis de la biodiversidad de poblaciones de *Bradyrhizobium* que nodulan *Lupinus albus* en el Norte de España.

Martínez-Molina, E.[1]*, Gantois, I.[1], Rivas, R.[1], Gomis, V.[1], León-Barrios, M.[2], Trujillo, M.[1], Mateos, P. F.[1], y Velázquez, E.[1]

*[1]Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Campus Miguel de Unamuno, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca. [2]Departamento de Microbiología y Biología Celular, Universidad de La Laguna, Spain. *emm@usal.es*

El género *Lupinus* comprende una gran número de especies que colonizan habitats muy diversos y que están ampliamente distribuídos a nivel mundial. La especie *L. albus* es una planta herbácea que crece en suelos ácidos y neutros y constituye una fuente alternativa de proteína para alimentación animal. En la provincia de Salamanca, las semillas de las variedades desamargadas de esta planta se utilizan como aperitivo en alimentación humana. En esta provincia hay muchos suelos de pH ácido abandonados de cultivos tradicionales que podrían albergar cultivos alternativos como el lupino.

La mayor parte de las cepas que nodulan *Lupinus* pertenecen al género *Bradyrhizobium* [1,2], pero no se han llevado a cabo estudios de los endosimbiontes que nodulan *Lupinus* en suelo del norte de España. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo ha sido el análisis polifásico de cepas aisladas a partir de *L. albus* en suelos de Salamanca y León.

Para agrupar las cepas aisladas se han utilizado los perfiles de TP-RAPD (two primers random amplified polymorphic DNA) que permiten diferenciar entre cepas de diferentes especies bacterianas [3]. Una cepa respresentativa de cada uno de los grupos obtenidos fue sometida a secuenciación completa del gen ribosómico 16S y las secuencias se compararon con las de las especies de *Bradyrhizobium* existentes en bases públicas así como con las de cepas aisladas de nódulos de distintas especies de *Lupinus* [2]. El análisis filogenético demostró que las cepas aisladas pertenecen a diferentes nuevas especies del género *Bradyrhizobium* filogenéticamente próximas a cepas aisladas en Canarias a partir de diferentes especies de *Lupinus* y de *Chamaecytisus proliferus*. Para confirmar estos resultados, actualmente se están llevando a cabo los estudios de hibridación de DNA-DNA total.

[1]Barrera L.L., Trujillo, M.E., Goodfellow, M., García, F.J., Hernández-Lucas, I., Dávila, G., van Berkum, P. y Martínez-Romero, E. 1997. Biodiversity of Bradyrhizobia nodulating Lupinus spp. Intern. J. Syst. Bacteriol. 47, 1086-1091.

[2]Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Donate-Correa, J., Rivas, R., Velázquez, E., Hernández, M., Temprano, F., Martínez-Molina, E., Ruiz-Argüeso, T. y León-Barrios, M. 2003. Genetic diversity of bacterial populations from diverse geographic origins that nodulate *Lupinus* spp. and *Ornithopus* spp. Syst. Appl. Microbiol. 26, 611-623.

[3]Rivas, R., Velázquez, E., Valverde, A., Mateos, P.F. y Martínez-Molina, E. 2001. A two primers random amplified polymorphic DNA procedure to obtain polymerase chain reaction fingerprints of bacterial species. *Electrophoresis* 22, 1086-1089.

SI-3

Caracterización de cepas que nodulan *Arachis hypogaea*.

Álvarez, E. R.[1]*, Rivas-Boyero, A. A.[1], Rivas, R.[1], Mateos, P.F.[1], Martínez-Molina, E.[1], y Velázquez, E.[1]

Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Campus Miguel de Unamuno, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca.
**alvarezestela@hotmail.com*

La planta del cacahuete (*Arachis hypogaea*) fue descubierta y cultivada por los primeros habitantes de América e introducida en Europa después del descubrimiento de América. Su nombre procede de la palabra azteca "thalcacahualt" y a finales del siglo XX se convirtió en un cultivo de gran importancia en Norteamérica mientras que en Europa es un cultivo minoritario. Su principal uso en alimentación humana es como fuente de aceite aunque su contenido en proteínas es muy elevado. Sus frutos se consumen secos y crudos o fritos en España y el aceite se utiliza en fabricación de productos alimenticios aunque su consumo es muy bajo comparado con el de otros países.

Tradicionalmente se sabe que esta leguminosa es nodulada por especies del género *Bradyrhizobium* [1,2,3], pero no se han llevado a cabo estudios de amplias poblaciones de sus endosimbiontes en diferentes localizaciones geográficas por lo que la taxonomía de estas bacterias no está bien establecida.

En este estudio se han analizado cepas de rhizobia de crecimiento lento capaces de nodular de un modo efectivo *Arachis hypogaea* a partir de un suelo de la provincia de Salamanca. Las cepas se han caracterizado mediante diversas técnicas moleculares (perfiles de LMW RNA y TP-RAPD) y fenotípicas (utilización de fuentes de carbono y producción de enzimas).

Las cepas aisladas mostraron una gran homogeneidad genotípica y fenotípica. La secuenciación completa del gen ribosómico 16S mostró que pertenecen al género *Bradyrhizobium* pero están alejadas filogenéticamente de las especies actualmente descritas en este género y en cambio son próximas a cepas aisladas a partir de nódulos de *Lupinus* aislados en el mismo suelo y de *Chamaecytisus proliferus* aisladas en Canarias. Estos resultados muestran la necesidad de llevar a cabo estudios de poblaciones más amplias de aislados de leguminosas noduladas por rhizobia de crecimiento lento ya que, de acuerdo con los datos de que disponemos actualmente, el género *Bradyrhizobium* contiene un número muy elevado de especies no descritas.

[1]Saleena, L.M., Loganathan, P., Rangarajan, S., y Nair, S. (2001). Genetic diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Arachis hypogaea*. Can. J. Microbiol. 47, 118-122.

[2]van Rossum, D., Schuurmans, F.P., Gillis, M., Muyotcha, A., van Verseveld, H.W., Stouthamer, A.H., y Boogerd, F.C. (1995). Genetic and phenetyc analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating peanut (iArachis Hypogaea L.) roots. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1599-1609.

[3]Zhang, X., Nick, G., Kaijalainen, S., Terefework, Z., Paulin, L., Tighe, S.W.; Graham, P.H., y Lindström, K. (1999). Phylogeny and diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from the root nodules of peanut. Syst. Appl. Microbiol. 22, 378-386.

SI-4

Caracterización de una nueva especie del género *Rhizobium* aislada de *Acacia* en Argentina.

Peix, A.[1]*, Rivas, R.[2], Abril, A.[3], Willems, A.[4], y Velázquez, E.[2]

[1]Departamento de Producción Vegetal. IRNA-CSIC. Salamanca. [2]Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Campus Miguel de Unamuno, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca. [3]Cátedra de Microbiología Agrícola. Facultad de Agronomía. Universidad de Córdoba. Argentina. [4]Laboratorium voor Microbiologie. Vakgroep Biochemie, Fysiologie en Microbiologie. Universiteit Gent K.L. Ledeganckstraat 35. B-9000 Gent. Belgium.
**alvarp@usal.es*

Las especies del género *Acacia* son leguminosas arbóreas ampliamente distribuídas en el mundo y cuyos endosimbiontes pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*[1,2,3]. *Acacia caven* es una especie ampliamente distribuída en suelos de Argentina cuyos endosimbiontes han sido escasamente estudiados. En este trabajo se han caracterizado dos cepas aisladas a partir de nódulos de *Acacia caven* en suelos de la provincia de Córdoba (Argentina) utilizando diferentes técnicas moleculares y fenotípicas.

Las dos cepas analizadas, ACA03 y ACA10, mostraron crecimiento rápido en YMA y en primer lugar fueron analizadas utilizando perfiles de TP-RAPD (two primers random amplified polymorphic DNA) que permiten establecer diferencias entre especies de bacterias. Ambas cepas mostraron el mismo perfil de TP-RAPD, lo que indica que pertenecen a la misma especie.

La secuencia completa del gen ribosómico 16S de la cepa ACA3 mostró que pertenece al género *Rhizobium* aunque dicha secuencia no coincide con ninguna de las especies de este género descritas hasta el momento.

La caracterización fenotípica se basó en la utilización de azúcares como fuente de carbono, la producción de enzimas y la resistencia natural a antibióticos. Los resultados obtenidos confirman los resultados obtenidos en la caracterización molecular. En la actualidad se están llevando a cabo estudios de hibridación de DNA total para establecer la categoría taxonómica de las cepas aisladas de *A. caven* en este estudio.

[1]Ba, S., Willems, A., de Lajudie, P., Roche, P., Jeder, H., Quatrini, P., Neyra, M., Ferro, M., Prome, J.C., Gillis, M., Boivin-Masson, C. y Lorquin, J. 2001. Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. Syst. Appl. Microbiol. 25, 130-145.

[2]Marsudi, N.D.S., Glenn, A.R. y Dilworth, M.J. Identification and characterization of fast- and slow- growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. Soil Biol. Biochem. 31, 1229-1238.

[3]Nuswantara, S., Fujie, M., Sukiman, H.I., Yamashita, M., Yamada, T. y Murooka, Y. 1997. Phylogeny of bacterial symbionts of the leguminous tree *Acacia mangium*. J. Ferment. Bioeng. 84; 511-518.

SI-5

Rhizobium lusitanum, una nueva especie de *Rhizobium* aislada de nódulos de *Phaseolus vulgaris*.

Valverde, A.[1]*, Igual, J. M.[1], Rodríguez-Barrueco, C.[1], Santa Regina, I.[1], Cervantes, E.[1], y Velázquez, E[2].

[1]Departamento de Producción Vegetal. IRNA-CSIC. C/Cordel de Merinas, 40-52; 37008 Salamanca. [2]Departamento de Microbiología y Genética. Edificio Departamental de Biología. Lab. 209. Universidad de Salamanca. Salamanca.
**avalverde@wwwedu-micro.dep.usal.es*

La alubia (*Phaseolus vulgaris*) es una planta cultivada a lo largo de todo el mundo y que presenta un gran interés agronómico. Se conocen al menos cinco especies de rhizobia capaces de establecer simbiosis con *Phaseolus* de forma natural y algunas más que lo hacen en condiciones de laboratorio(1). Por tanto, se puede decir que *Phaseolus* es una planta hospedadora muy promiscua.

En el presente trabajo se han aislado varias cepas de rhizobia, a partir de nódulos de plantas de *Phaseolus* crecidas en diferentes suelos del Noroeste de Portugal, que se han caracterizado utilizando diferentes métodos tanto genotípicos como fenotípicos.

El análisis de la secuencia del ADN ribosómico 16S (1471 pb) indica que las cepas estudiadas se hallan, filogenéticamente hablando, muy próximas a *Rhizobium rhizogenes* (99,9 % de similitud). Sin embargo, un estudio más pormenorizado, en el que se han incluido ensayos de reinfección y reaislamiento, pruebas fenotípicas (crecimiento en diversos sustratos, crecimiento a distintas temperaturas, etc.) y pruebas genotípicas (TP-RAPDs, RFLPs, perfiles de LMW-RNA, etc.), muestra que se trata de un conjunto de cepas claramente distinto a las conocidas con anterioridad. Así mismo, como prueba definitiva, se analizó el porcentaje de hibridación ADN-ADN, resultando que dicho porcentaje es del 99% para dos de las cepas representativas de este grupo (P1-07 y P2-20), mientras que para las cepas P1-7 y *R. rhizogenes* (DSM 30148^T) dicho porcentaje se sitúa en el 28,9%. Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que dicho porcentaje es claramente inferior al 70 % (2), se puede concluir que las cepas estudiadas constituyen una nueva especie, que ha sido denominada *Rhizobium lusitanum*.

[1]Martínez-Romero, 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil. 252*:11-23.
[2]Wayne et al., 1987. Report of the Ad Hoc Committee on reconciliation of approaches to Bacterial Systematic. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:463-464.

SI-6

Nodulación de *Citysus scoparius* y *Phaseolus vulgaris* por cepas del patógeno humano *Ochrobactrum anthropi*.

Velázquez, E.[1]*, Zurdo-Piñeiro, J.L.[1], Rivas, R.[1], Trujillo, M.[1], Vizcaíno, N.[1], Carrasco, J.A.[2], Chamber, M.[2], Ludeña, D.[3], Muñoz de la Pascua, L.[4], Jiménez, R.[5], Willems, A.[6], Mateos, P.F.[1], y Martínez-Molina, E.[1]

[1]Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Campus Miguel de Unamuno, Universidad de Salamanca. Salamanca. [2]CIFA Las Torres. Alcalá del Río. Sevilla. Spain. [3]Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Clínico Universitario. Salamanca. Spain. [4]Servicio de Experimentación Animal. Universidad de Salamanca. Salamanca. Spain. [5]Departamento de Fisiología y Farmacología. Universidad de Salamanca. Salamanca. Spain. [6]Laboratorium voor Microbiologie. Vakgroep Biochemie, Fysiologie en Microbiologie. Universiteit Gent K.L. Ledeganckstraat 35. B-9000 Gent. Belgium.
**evp@usal.es*

La especie *Ochrobactrum anthropi* [(1)] es un patógeno oportunista que causa diversas infecciones en el hombre y pertenece a la familia *Brucellaceae*. Aunque una especie del género *Ochrobactrum*, *O. tritici*, ha sido aislada de rizosfera de trigo [(2)], hasta el momento no hay ninguna especie de este género que nodule leguminosas.

En este estudio se han aislado dos cepas, Esc1 y Esc5, a partir de nódulos originados en *Cytisus scoparius* que presentaban un crecimiento muy rápido en YMA. La secuencia completa del gen ribosómico 16S mostró una similitud del 100% con *O. anthropi*.

El análisis de los plásmidos presentes en estas dos cepas mostró la existencia de, al menos, un megaplásmido de mayor peso molecular que el pSym de *S. meliloti* GR4 que fue utilizada como referencia. Los genes *nodD* y *nifH* fueron amplificados y secuenciados, localizándose en el material extracromosómico de las cepas aisladas.

La cepa Esc1 fue inoculada en ratones en condiciones de laboratorio comprobándose que se producían síntomas de infección similares a los producidos por *Brucella*, fundamentalmente esplenomegalia, incremento de los linfocitos en sangre y alteración de las enzimas hepáticas con respecto a los controles sin infectar.

Por tanto, es posible que bacterias patógenas para el hombre puedan adquirir genes simbióticos que les permitan nodular plantas a la vez que mantienen su capacidad infectiva en animales. Esto abre una nueva vía de investigación desde el punto de vista de la interacción de bacterias con organismos superiores.

[1]Holmes, B., Popoff, M., Kiredjian, M. y Kersters, K. 1988. *Ochrobactrum anthropi* gen. nov., sp. nov. from human clinic specimens and previously known as group Vd. Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 406-416.

[2]Lebuhn, M., W. Achouak, M. Schloter, O. Berge, H. Meier, M. Barakat, A. Hartmann and T. Heulin. 2000. Taxonomic characterization of *Ochrobactrum* sp. isolates from soil samples and wheat roots and description of *Ochrobactrum tritici* sp. nov. and *Ochrobactrum grignonense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.. 50: 2207-2223.

SI-7

Caracterización de cepas de *Bradyrhizobium* capaces de nodular *Pachyrhizus ahipa*.

Camacho, M.[1]*, Rodríguez-Navarro, D.N.[1], Rivas, R.[2], Leidi, E.O.[3], y Velázquez, E.[2]

[1]*CIFA "Las Torres y Tomejil", Apdo. Oficial, 41200, Alcalá del Río, Sevilla*
[2]*Departamento de Microbiología y Genética, Facultad de Farmacia, Edificio Departamental, Universidad de Salamanca, Salamanca*
[3]*Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Svilla. CSIC, Avda Reina Mercedes 10, 41012, Sevilla*
**maria.camachomartinez.ext@juntadeandalucia.es*

Las leguminosas del género Pachyrhizus se cultivan en varios países del continente americano, donde constituyen una fuente alternativa para la producción de almidón, aceite y proteínas. Los microsimbiontes de estas especies leguminosas están poco estudiados, pero se conoce que nodulan tanto con rizobios de crecimiento rápido como con lentos.

En este trabajo, se analiza una colección de estirpes de rizobios, procedente de varios países, capaces de nodular en *Pachyrhizus ahipa*, usando estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares. Los resultados obtenidos por perfiles de proteínas y de lipopolisacáridos en SDS-PAGE y por TP-RAPD, muestran una gran diversidad entre los aislamientos, aunque todos poseen un crecimiento lento (tiempos de generación superiores a 5.30 h) en medio YMA. Estos resultados se han confirmado mediante la secuenciación del rRNA 16S, que demostró que la mayoría de las estirpes pertenecen a diferentes especies del género *Bradyrhizobium*. Tres de las estirpes estudiadas se agrupan con *B. elkanii*, mientras que las demas aparecen filogenéticamente relacionadas con *B. japonicum*, *B. liaoningense* y *B. yuanmingense*, y, probablemente se trate de especies nuevas.

SI-8

Aislamiento y caracterización de una nueva especie del género *Rhizobium*.

García-Fraile, P.*, Velázquez, E., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., y Rivas, R.

Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Campus Miguel de Unamuno, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca.
**loskypaulosky@yahoo.es*

Las bacterias del género *Rhizobium* se han considerado habitualmente endosimbiontes de leguminosas y su identificación, salvo cuando se aislaban a partir de nódulos, era muy difícil. Sin embargo, con el desarrollo de la secuenciación automática de ácidos nucleicos, especialmente del gen ribosómico 16S, cualquier especie puede ser identificada a partir de cualquier ecosistema.

Aunque hay algunas especies de rhizobia recientemente descritas que no nodulan, como *Sinorhizobium morelense* [3] y *Bradyrhizobium betae* [1], no es común la identificación de especies de rhizobia a partir de fuentes diferentes a los nódulos de las leguminosas.

En este estudio se ha aislado una cepa del género *Rhizobium* a partir de troncos de álamo parcialmente deteriorados por la intemperie sobre placas conteniendo xilano como fuente de carbono aunque la cepa aislada no mostró actividad xilanolítica.

La secuencia completa del gen ribosómico 16S mostró que esta cepa pertenece al género *Rhizobium* aunque está situada en una rama muy alejada del resto de las especies de este género situada dentro del grupo filogenético de *R. galegae* y *R. huautlense*.

Los intentos de amplificar los genes *nodD* y *nifH* utilizando primers universales que han permitido la amplificación y secuenciación de estos genes en la especie *Devosia neptuniae* [2] no han dado hasta el momento resultados positivos.

Estos resultados, junto con los previamente mencionados, muestran que la biodiversidad de las especies de géneros tradicionalmente considerados como rhizobia es muy alta y que las técnicas de biología molecular permitirán en el futuro la identificación de nuevas especies que no forman nódulos en leguminosas. Estos hallazgos nos permitirán profundizar en el estudio de la evolución de los rhizobia y de la adquisición de genes simbióticos por estas bacterias.

[1]Rivas, R., Willems, A., Palomo, J.L., García-Benavides, P., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Gillis, M., Velázquez, E. 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. nov. isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumor-like deformations. Int J. Syst. Evol. Microbiol. In press.

[2]Rivas, R., Velázquez, E., Willems A., Vizcaíno N., Subba-Rao N. S., Mateos P. F., Gillis M., Dazzo F. B., & Martínez-Molina E. 2002. A new species of *Devosia* that forms a nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L. f.) Druce. *Appl Environ Microbiol* 68, 5217-5222.

[3]Wang, E.T., Tan, Z.Y., Fernández-López, M., Reinhold-Hurek, B. y Martínez-Romero, E. 2002. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala* associated bacterium that is highly resitant to multiple antibiotics. Int J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1687-1693.

SI-9

Nodulación de *Cicer arietinum* por cepas de *Mesorhizobium amorphae* en suelos del Norte de España.

Rivas, R.*, Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., y Velázquez, E.

Departamento de Microbiología y Genética, Edificio Departamental de Biología, Campus Miguel de Unamuno, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca.
**raul@wwwedu-micro.usal.es*

El género *Cicer* tradicionalmente ha sido considerado como un hospedador restrictivo en lo que se refiere a la nodulación [2]. Hasta hace poco tiempo, sólo se sabía de dos especies capaces de nodular *Cicer arietinum* concretamente *Mesorhizobium mediterraneum* y *Mesorhizobium ciceri*. Sin embargo, en los años 2001 y 2002 han sido aisladas en Túnez y Marruecos cepas de garbanzo que probablemente pertenezcan a las especies *Sinorhizobium medicae* y *Sinorhizobium meliloti* [1,4]. Además, recientemente varias cepas que nodulan garbanzo en España y Portugal han sido identificadas como *Mesorhizobium tianshanense* [3,5].

Estos datos indican que *Cicer arietinum* no es un hospedador tan restrictivo como se creía. Esta afirmación esta apoyada por los resultados obtenidos en este trabajo donde hemos aislado tres cepas que nodulan garbanzo en suelos de León y que han sido identificadas como *Mesorhizobium amorphae*.

Debido a que *Mesorhizobium amorphae* no es un simbionte conocido de *Cicer arietinum*, se analizó la secuencia del gen *nod*C que es un gen esencial para la nodulación en todas las especies de rhizobia investigadas hasta el momento. El análisis de las secuencias del gen *nod*C, mostró que nuestras cepas estaban filogenéticamente relacionadas con el gen *nod*C de *Mesorhizobium ciceri*, uno de los endosimbiontes habituales de *Cicer arietinum*.

[1]Aouani, M.E., Mhamdi, R., Jebara, M. and Amarger, N. (2001). Characterization of rhizobia nodulating chickpea in Tunisia. *Agronomie* 21, 577-581.

[2]Broughton, W. J.,and Perret, X. (1999). Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Curr. Opinion in Plant Biol.* 2, 305-311.

[3]Laranjo, M., Machado, J., Young, J. P. W. and Oliveira, S. (2004). High diversity of chickpea *Mesorhizobium* species isolated in a Portuguese agricultural region. *FEMS Microbiol. Ecol.* (En prensa).

[4]Maâtallah, J., Berraho, E.B., Munoz, S., Sanjuan, J. and Lluch, C. (2002). Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. *J. Appl. Microbiol.* 93, 531-540.

[5]Rivas, R., Peix, A., Mateos, P. F., Trujillo, M. E., Martínez-Molina, E. and Velázquez E. (2004). Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil* (En prensa).

SI-10

Sinorhizobium morelense es una bacteria simbiótica inestable.

Ramírez-Bahena, M. H.[1, 2*], Lemos, A.[1], y Wang, E.T.[1]

[1] *Departamento de Microbiología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México D. F., México.*
[2] *Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca.*
**lisina_r_b@yahoo.com.mx*

La nodulación en plantas leguminosas es un proceso simbiótico originado por la interacción de las plantas con algunas bacterias, a las que se les ha denominado colectivamente como rizobia; estas bacterias noduladoras poseen genes simbióticos, incluyendo los genes de nodulación y de fijación de nitrógeno. No obstante dentro de este grupo de rizobios podemos encontrar a *Sinorhizobium morelense*, bacteria no simbiótica, la cual fue aislada en suelo de México a partir de los nódulos de raíces de la leguminosa arbórea *Leucaena leucocephala*; inmediatamente después de su aislamiento su habilidad de nodulación en esta planta pudo ser confirmada así como la presencia de plásmidos; sin embargo, después de su almacenamiento, las cepas obtenidas de esta especie no lograron ratificar por segunda vez su capacidad de nodular en la planta huésped original y los plásmidos detectados anteriormente habían desaparecido.

Éste último hecho puede ofrecer una explicación a la existencia de bacterias no simbióticas en nódulos, suponiendo que las mismas son capaces de entrar a nódulos formados por otras bacterias simbióticas o que tal vez poseen un plásmido simbiótico inestable.

Durante este estudio se demostró que (1) *S. morelense* LC04^T es una bacteria simbiótica inestable, que es capaz de obtener estos genes mediante conjugación y después perderlos rápidamente; (2) *S. morelense* Lc04^T puede considerarse una bacteria endofitica, rizosférica y promotora del crecimiento de plantas; y esto lo hace posible, su capacidad de adquirir plásmidos simbióticos a partir de otros rizobios; (3) si bien , *S. morelense* Lc04^T no contiene genes simbióticos, puede ocupar algunos nódulos cuando se encuentra rodeado de otras bacterias simbióticas.

Estas observaciones podrían brindar una explicación del porqué bacterias consideradas como no simbióticas se han aislado frecuentemente a partir de nódulos de leguminosas.

SI-11

Paenibacillus cineris, *P. cookii* y *P. wynnii*, tres nuevas especies fijadoras de nitrógeno atmosférico originarias de la Antártida.

Rodríguez-Díaz, M.[1], Logan, N.A.[1], y Rodelas, B. [2]*

[1]Department of Biological and Biomedical Sciences, Glasgow Caledonian University, Cowcaddens Road, Glasgow G4 0BA, U.K., [2]Grupo de Microbiología Ambiental, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Campus de Cartuja s/n, Universidad de Granada, 18071 Granada, ESPAÑA.

Muestras de suelo tomadas en diferentes puntos en Candlemas Island, South Sandwich archipiélago, y Mars Oasis, Alexander Island, (Antártida), contenían 3 grupos diferentes de bacterias formadoras de esporas. Los 3 grupos fueron identificados mediante taxonomía polifásica como 3 especies noveles de *Paenibacillus*, las cuales fueron descritas como *Paenibacillus cineris*, *P. cookii* [(4)] y *P. wynnii* [(5)].

La reconocida capacidad de numerosas especies del género *Paenibacillus* para fijar nitrógeno [(1)] y el pobre contenido en este elemento discutido por varios autores para suelos antárticos [(2,3,7)], apuntan hacia la posibilidad de que estas nuevas especies sean diazotrofas. Cepas de cada una de las 3 especies fueron seleccionadas para comprobar la presencia del gen de la nitrogenasa reductasa, *nifH*, en sus genomas. Como controles positivos se escogieron las siguientes cepas de referencia, *Paenibacillus durus* (LMG 14659^T), *P. borealis* (LMG 21603^T) y *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (CECT 4585). Un segmento de aproximadamente 360 pb del gen *nifH* se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores descritos por Poly *et al.* [(6)].

P. cineris y *P. cookii* no mostraron ningún amplicón del segmento *nifH,* mientras que todas las cepas de *P. wynnii* mostraron bandas del tamaño esperado. Los fragmentos obtenidos en 6 de estas cepas fueron secuenciados, dando una alta homología con la secuencia del gen *nifH* de cepas de otras especies de *Paenibacillus* previamente descritas como fijadoras de N_2. El test de reducción de acetileno se llevó a cabo para confirmar la expresión de la actividad nitrogenasa en las tres especies.

El trabajo de B. Rodelas ha sido financiado por el MCYT (Programa Ramón y Cajal).

[1] Achouak, W., Normand, P. & Heulin, T. (1999) Comparative phylogeny of rrs and nifH genes in the *Bacillaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 49: 961-967

[2] Holdgate, M.W., Allen, S.E. & Chambers, M.J.G. (1967) A preliminary investigation of the soils of Signy Island, South Orkney Islands. *Brit Antarct Surv Bull* 12: 53-71

[3] Lewis Smith, R.I. (1988) Bryophite oases in ablation valleys on Alexander Island, Antarctica *The Bryologist* 9: 45-50

[4] Logan, N.A., De Clerck, E., Lebbe, L., Verhelst, A., Goris, J., Forsyth, G., Rodríguez-Díaz, M., Heyndrickx, M. & De Vos, P. (2004) *Paenibacillus cineris* sp. nov. and *Paenibacillus cookii* sp. nov. from Antarctic volcanic soils and a gelatin processing plant. *Int J Syst Evol Microbiol (En prensa)*

[5] Rodríguez-Díaz, M., Lebbe, L., Rodelas-González, B., Heyrman, J., De Vos, P. and Logan, N.A. (Submitted) Proposal of *Paenibacillus wynnii* sp. nov., isolated from Alexander Island, Antarctica. *Int J Syst Evol Microbiol.*

[6] Poly, F., Jocteur Monrozer, L., & Bally, R. 2001 Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res Microbiol* 152: 95-103

[7] Wynn-Williams, D.D. (1996) Response of pioneer soil microalgal colonists to environmental change in Antarctica. *Microb Ecol* 31: 177-188

SI-12

Heterogeneidad de rizobios como bioindicador de efectos inducidos por plantas genéticamente modificadas en la rizosfera de *Arabidopsis thaliana*.

Garcia-Villaraco, A., Lucas García, J.A., Barriuso, J., y Probanza, A.*

Departamento de CC Ambientales y Recursos Naturales. Facultad de Ciencias Experimentales y de la Salud. Universidad San Pablo CEU. Urb. Montepríncipe. Ctra. Boadilla del Monte, Km 5,300. 28668 Boadilla del Monte, Madrid.
**a.probanza@ceu.es*

El conocimiento de la Ecología de la rizosfera en plantas transgénicas requiere nuevos estudios, que aporten informacion del sistema a fin de completar los protocolos de bioseguridad para evaluar el impacto de nuevas lineas transgénicas (TGs). En este sentido, Kowealchuk et al. (2003)[1] señalan a los microorganismos simbióticos fijadores de nitrógeno como un grupo indicador de *vulnerabilidad* causada por plantas TGs. A partir de la evidencia de que cambios en la fisiología de las plantas (p.e. plantas TGs) conducen a cambios en las comunidades rizosféricas[2], el objetivo del presente trabajo fue el estudio de las poblaciones de rizobios (*lato sensu*) en la rizosfera de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Se usaron las líneas NASC 8035, 224 y 8637 (la primera mutante, las otras TGs) y plantas control (Col 0 NASC 1093) de la que derivan las líneas anteriores. Las plantas se crecieron en un suelo de encinar, muestreándose las rizosferas al final del ciclo fenológico (aparición de las silicuas). El análisis de rizobios se llevaría a cabo mediante PCR-TGGE, utilizandose los *primers* especificos del gen *nodC*.

En la puesta a punto del método se hicieron amplificaciónes exitosas (y repetitivas) de *Sinorhizobium fredii* (cepas SMH12 y HHWT103). Sin embargo al realizar las electroforesis de productos de PCR de las muestras rizosfericas (previa a la PCR con grapa, para TGGE) no se detectaron bandas, pese a testarse diversos procedimientos de extracción del DNA, lavado del mismo y amplificación (reacción y condiciones). Widmer et al. (1999)[3] realizaron un estudio análogo utilizando *nested* PCR y *primers* para *nifH*. Los productos fueron clonados y analizados por RFLP. En este caso los autores si detectan presencia, si bien el *pool* de DNA objeto, es mayor que en nuestro caso toda vez que aquella aproximación da indicaciones respecto a bacterias que pueden codificar la nitrogenasa reductasa, enzima no exclusiva de las rizobiaceas.

La hipótesis más plausible a partir de estos resultados, era que la proporción de rizobios en las muestras se encontrasen por debajo del umbral de detección de la amplificación. Para ello se inocularon siete muestras de suelo con la cepa SMH12 de *Sinorhizobium fredii* en una concentración de 10^8 a 10^2 células/g suelo, utilizando el suelo de encinar antes referido. Este análisis nos ha permitido establecer la viabilidad de la apróximación y el umbral mínimo de rizobios que la hace aplicable. Nuestros resultados también permiten deducir que otras aproximaciones, como el clonaje[4] no sería tampoco abordable a bajas concentraciones del grupo de organismos.

[1]Kowealchuk et al., 2003. Trends. Ecol Evol 8:403-410.
[2]Grayston et al., 1996. Appl. Soil Ecol. 18: 29-56.
[3]Widmer et al., 1999 Appl. Environ. Microbiol. 65:374-380.
[4]Marilley y Aragno, 1999 Appl. Soil Ecol. 13:127-136.

SI-13

Halomonas maura, un microorganismo halófilo moderado que fija el nitrógeno atmosférico.

Fernández-Carazo, R.[1]*, Argandoña, M.[2], Llamas, I.[1], Martínez-Checa, F.[1], Caba, J.[3], Quesada, E.[1] y del Moral, A.[1]

[1]Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, [3]Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, 18071 Granada.
[2]Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, 41012. Sevilla.
**rafafercarazo@hotmail.com*

Halomonas maura cepa S31^T es una bacteria halófila moderada aislada de suelos salinos del Norte de Marruecos (2). Este microorganismo, que crece óptimamente en medios con un 7,5% p/v de NaCl, se caracteriza por sintetizar elevadas cantidades de un polímero extracelular (EPS) conocido como maurano (1).

Al igual que la mayoría de las especies de su género, *Halomonas maura* posee un metabolismo respiratorio quimioorganotrofo, con la particularidad de que es capaz de crecer en anaerobiosis utilizando el nitrato como último aceptor de electrones. En un estudio reciente se ha descrito el operón *ccoNOQP* que codifica para una citocromo *c* oxidasa de tipo cbb_3, relacionada con la respiración en bajas concentraciones de oxígeno.

La existencia de esta citocromo *c* oxidasa cbb_3, presente en muchas bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico en microaerobiosis y, en ocasiones, responsable de dicho proceso, nos decidió a investigar esta capacidad en *Halomonas maura* S31^T.

En este trabajo hemos podido comprobar que efectivamente este microorganismo fija el nitrógeno en microaerobiosis. Por una parte, se ha identificado en esta bacteria el gen *nifH*, uno de los genes estructurales de la enzima nitrogenasa, que por tener una secuencia altamente conservada permite su utilización en estudios filogenéticos (5). Así pues, hemos empleado oligonucleótidos degenerados diseñados a partir de las zonas génicas más conservadas resultantes del alineamiento de numerosas secuencias *nifH* procedentes de diferentes microorganismos (3,4). Por otra parte, se ha detectado la actividad nitrogenasa mediante el test de reducción de acetileno (ARA) de cultivos puros en medio semisólido libre de nitrógeno.

[1]Arias, S., del Moral, A., Ferrer, M.R., Quesada, E., Béjar, V. 2003. Mauran, an exopolysaccharide produced by the halophilic bacterium *Halomonas maura*, with a novel composition and interesting properties for biotechnology. Extremophiles. 7: 319-326.
[2]Bouchotroch, S., Quesada, E., del Moral, A., Llamas, I., Béjar, V. 2001. *Halomonas maura* sp. nov., a new moderately halophilic, exopolysaccharide-producing bacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:1625-1632.
[3]Burgmann, H., Widmer, F., Von Sigler, W., y Zeyer, J. 2004. New molecular screening tools for análisis of free-living diazotrophs in soil. Appl. Environ. Microbiol. 70: 240-247.
[4]Poly F., Monrozier, L.J., Bally, R. 2001. Improvement in the RFPL procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. Res. Microbiol. 152: 95-103.
[5]Zehr, J.P., Jenkins, B.D. Short, S.M., y Steward, G.F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. 5: 539-554.

SI-14

Desarrollo de un modelo para la ecología y evolución de la relación *Rhizobium*-leguminosa.

Marco, D.*, y Sanjuán, J.

Laboratorio de Fijación de Nitrógeno, Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
**diana.marco@eez.csic.es*

Las relaciones mutualistas entre organismos plantean problemas ecológicos y evolutivos que aún requieren resolución. La asociación planta-*Rhizobium* constituye un sistema ideal para el abordaje de esos problemas desde diferentes enfoques, que pueden integrarse y formalizarse en el contexto del modelado matemático. De esta manera, se pueden abordar preguntas tan diversas como ¿Por qué los rizobios invierten energía en la fijación de Nitrógeno, en beneficio de la planta, cuando su propio beneficio no está claro?, hasta ¿Cuál es la mejor estrategia para que un inoculante no pierda eficacia en el tiempo?

En este trabajo se presentará un modelo específicamente desarrollado para analizar aspectos teóricos y aplicados del mutualismo *Rhizobium*-leguminosa. En la formulación del modelo se tienen en cuenta siguientes factores:

-Dinámicas ecológicas de los organismos implicados (tasas poblacionales e interacciones intra e interespecíficas)
-Relaciones costo-beneficio para los organismos implicados
-Altruismo
-Generosidad en el intercambio y tasas evolutivas
-Defraudación por bacterias no fijadoras y mecanismos de sanción por parte de la planta.

Se discutirán los productos obtenidos del modelado, como resultados medibles y/o predictivos (por ejemplo, relaciones costo-beneficio de distintas prácticas de inoculación), y no medibles (formulación de nuevas hipótesis de trabajo).

Sesión II.

Genética, genómica y proteómica de los microorganismos diazotróficos y de plantas asociadas

SII-P1-P2

La era post-genoma: nuevas herramientas y estrategias para la investigación en Fijación de Nitrógeno.

Juan Imperial[1], Juan Sanjuán[2].

[1]Departamento de Biotecnología, E.T.S. de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid. 28040 Madrid.
[2]Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, E. E. del Zaidín-CSIC. Prof. Albareda 1, 18008 Granada.

Desde el año 1998 en que apareció publicada la secuencia del genoma del plásmido simbiótico pNGR234a, el número de genomas secuenciados relacionados con el proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno no ha dejado de crecer. Desde hace algún tiempo son de acceso público las secuencias de los genomas completos de varias bacterias fijadoras de nitrógeno, de plásmidos e islas simbióticas, y próximamente se espera que sean completadas las secuencias genómicas de varias otras bacterias y plantas de interés en este campo de la investigación científica. La cantidad de información que nos proporcionan las secuencias genómicas es una herramienta nueva que debemos ser capaces de aprovechar para avanzar en los estudios e investigaciones dirigidos a un mejor aprovechamiento de este proceso biológico de tanta importancia ecológica y agronómica. De partida, las secuencias nos permiten realizar estudios comparativos de la estructura y organización de plásmidos e islas simbióticas de rizobios, así como entre los genomas de bacterias fijadoras y no fijadoras de nitrógeno, al objeto de dilucidar aspectos relacionados con la evolución del proceso de fijación de nitrógeno. La genómica computacional facilita mucho estos estudios comparativos, como también ha de facilitar la predicción de funciones en proteínas, entre otras.

Las secuencias proporcionan además la información necesaria para poder construir nuevas y específicas herramientas de trabajo, para estudios de transcriptómica y proteómica, o facilitan el uso de otras técnicas más generalistas. Tanto para bacterias como para plantas asociadas, la construcción de arrays o chips de DNA para su uso en estudios de transcriptómica está permitiendo abordar estudios que hasta hace pocos años eran inconcebibles. La metabolómica permite, como las anteriores técnicas o estrategias de estudio, la posibilidad de aproximaciones mas globales en la experimentación. La construcción de mutatecas, bancos de mutantes de todos los genes de un organismo, acelerará mucho todos los estudios genéticos. Además, el advenimiento de éstas y otras técnicas que con seguridad surgirán en los próximos años, debe permitirnos afrontar el reto de la biotecnología de la fijación de nitrógeno con mayores garantías que en el pasado. Además de su utilidad para profundizar en el conocimiento de los diversos procesos, las técnicas de la era post-genoma deben servir, de manera ineludible, para acelerar la aplicación de estos conocimientos a la solución de problemas agronómicos. Conservación de recursos genéticos, mejora genética, selección, cambio de ciertos usos agronómicos, etc., son todos susceptibles de mejora, siempre que el enorme conocimiento que se puede generar en los próximos años sea utilizado de forma racional para intentar resolver los diversos problemas a los que sigue enfrentándose la agricultura, sobre todo en los países con economías menos favorecidas.

SII-1

Regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli*.

Pérez-Mendoza, D.[1], Muñoz, S.[1]*, Nogales, J.[1], Pando, V.[2], Sepúlveda, E.[2], Romero, D.[2], Brom, S.[2], Olivares, J.[1], Herrera-Cervera, J. A.[1], Sanjuán, J.[1]

[1]Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
[2] Programa de Genética Molecular de Plásmidos Bacterianos, CIFN, UNAM. A.P. 565-A, Cuernavaca, Mor. México.
**soco@eez.csic.es*

Dentro de las diferentes especies descritas como simbiontes de judía, aquellas cepas clasificadas como biovar phaseoli se caracterizan por poseer 3 copias de *nifH* en su plásmido simbiótico. Este pSym es muy parecido entre todas ellas, lo que sugiere un evento de transferencia genética horizontal de dicho plásmido [(1)]. Recientemente se ha puesto de manifiesto que la capacidad de autotransferencia del plásmido simbiótico de *R. etli* (pRetCFN42d) en condiciones de laboratorio es dependiente de la sobre-expresión del gen *ypo28* en la célula donadora [(2)]. Este hecho sugiere la existencia de una regulación estricta en la transferencia conjugativa de éste plásmido.

Con la idea de identificar otros posibles genes implicados en la regulación de la transferencia conjugativa del plásmido pRetCFN42d, se llevó acabo una mutagénesis al azar empleando la transferencia conjugativa del plásmido como selección positiva de los mutantes. Tras el análisis de 11 transposantes, fueron identificados 5 inserciones diferentes, dichas inserciones han demostrado provocar la desregulación del plásmido pRetCFN42d permitiendo su autotransferencia a altas frecuencias (hasta 10^{-3}):

- Dos de ellas (Tn*5*.1 y Tn*5*.2) son inserciones distintas e independientes en el gen *Ypo38* en dos puntos diferentes. Este gen se localiza adyacente al operón *virB* y pese a ser de función desconocida ha demostrado tener genes ortólogos en los plásmidos pSymA de *Sinorhizobium meliloti* y pAtC58 de *Agrobacterium tumefaciens*.
- La inserción Tn*5*.6 se localiza en el promotor del gen *ypo28* y su fenotipo Tra^+ se vincula al observado anteriormente por este gen (Pérez-Mendoza et al., sometido).
- Las inserciones Tn*5*.8 y Tn*5*.13 interrumpen los genes *ypo55* e *ypo47* respectivamente, ambos de función desconocida aunque el teórico producto codificado por el gen *ypo47* presenta homología con proteínas sensoras de sistemas de 2 componentes.

El estudio de expresión, mediante fusiones transcripcionales, de los genes *ypo28*, *ypo38* y del resto de genes implicados en la transferencia conjugativa (*tra* y *vir*), en los diferentes fondos mutantes, ha permitido elaborar un modelo de regulación de la transferencia conjugativa del plásmido simbiótico de *R. etli*. Este modelo estaría compuesto por elementos represores (*ypo38*) y activadores (*ypo28*) que mediante actuaciones cruzadas impedirían la transferencia del plásmido en condiciones de laboratorio, permitiendo su transferencia conjugativa sólo ante condiciones ambientales aún desconocidas.

[1]Brom et al., 2002. Appl.Environ.Microbiol. 68:2555-61
[2]Pérez-Mendoza et al., sometido.

SII-2

Estudio *in vitro* e *in vivo* de la actividad relaxasa (TraA) del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli*; implicaciones evolutivas en plásmidos de la familia Rhizobiaceae.

Pérez-Mendoza, D.[1]*, Lucas, M.[2], Muñoz, S.[1], Herrera-Cervera, J. A.[3], Olivares, J.[1], de la Cruz, F.[2], Sanjuán, J.[1]

[1]Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
[2]Departamento de Biología Molecular (Unidad asociada al CIB, CSIC), Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, 39011 Santander.
[3]Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada.
**dpmendoza@eez.csic.es*

La relaxasa es la proteína clave de un complejo nucleoproteico conocido por relasoxoma, el cual está directamente implicado en el reconocimiento, corte y transferencia conjugativa de un determinado ADN entre dos células. El relaxosoma reconoce una región específica en el ADN que va a ser transferido que se conoce como origen de transferencia (*oriT*) siendo ésta la única función en *cis* necesaria para la transferencia conjugativa de un determinado ADN [(1)]. Dentro del *oriT* se encuentra el punto de inicio de la transferencia o sitio *nic*, punto exacto donde se va a producir la rotura del enlace fosfodiester de la hebra de ADN que será transferida covalentemente unida a la relaxasa hasta la célula receptora.

La secuencia del plásmido simbiótico de *Rhizobium etli* pRetCFN42d [(2)] ha revelado la existencia una región *mob* compuesta por los genes *traA* y *traC,D,G* que se transcriben de forma divergente y entre los cuales se situaría el hipotético *oriT*. El gen *traA* codificaría la hipotética relaxasa que junto con el producto de los genes *traC* y *traD* formaría el relaxosoma. La proteína TraG conectaría el complejo ADN-relaxasa con el sistema de secreción tipo IV implicado en el transporte a la célula receptora.

En este trabajo se presenta la caracterización molecular de la proteína TraA. La purificación del dominio relaxasa N265TraAp42d, ha permitido poner de manifiesto la función nickasa de la proteína. Además, por primera vez se ha llevado acabo la determinación exacta del sitio *nic* de un plásmido de la familia Rhizobiaceae (pRetCFN42d) habiéndose encontrado grandes semejanzas con sitios *nic* pertenecientes a plásmidos del grupo IncQ.

Mediante ensayos de corte (*in vitro*), incubando la proteína con oligos que poseen sitios *nic* de distintos plásmidos, y ensayos de movilización (*in vivo*) con distintos *oriT*s se ha podido establecer relaciones filogenéticas funcionales entre los distintos plásmidos de la familia Rhizobiaceae. Concluyendo, la relaxasa TraA del plásmido pRetCFN42d es activa y presenta una limitada funcionalidad cruzada reconociendo solamente *oriT*s de plásmidos filogenéticamente muy cercanos como el pSymA y pSymB de *Sinorhizobium meliloti*.

[1]Lanka et al., 1995, Annu. Rev. Biochem., 64: 141-169
[2]González et al., 2003, Genome Biol., 4: R36.

SII-3

Análisis del transcriptoma de *Sinorhizobium meliloti* en respuesta a choque osmótico.

Domínguez-Ferreras, A.[1]*, Pérez-Arnedo, R.[1], Becker, A.[2], Soto, M.J.[1], Olivares, J.[1], y Sanjuán, J.[1]

[1]Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín, CSIC, E-18008 Granada, España
[2]Lehrstuhl für Genetik, Fakultät für Biologie, Universität Bielefeld, D-33501 Bielefeld, Alemania
**Ana.Dominguez@eez.csic.es*

En sus hábitats naturales, los organismos están a menudo expuestos a cambios en la osmolaridad del medio, a los que han adaptarse para mantener la integridad celular. La adaptación a un choque osmótico incluye cambios en la actividad de enzimas y transportadores así como variaciones a nivel transcripcional.

Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio nos han permitido elaborar la hipótesis de que los bacteroides de *Rhizobium*, en el interior de los nódulos de las leguminosas, necesitan para su normal funcionamiento genes que son necesarios para la osmoadaptación de la bacteria en vida libre (Nogales et al. (2002) Mol. Plant-Microbe Interact. 15: 225-232). Con el objetivo final de determinar si existe una correlación entre la capacidad de adaptación de la bacteria a estrés osmótico en condiciones de vida libre y su capacidad para establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno con plantas leguminosas, se ha llevado a cabo el estudio de cambios globales en la expresión génica de *S. meliloti* en respuesta a un choque osmótico, mediante el uso de microarrays.

El estrés osmótico se ha aplicado mediante la adición de dos compuestos: NaCl, que provoca estrés osmótico e iónico, y sacarosa. De cada uno de estos compuestos se emplearon dos concentraciones: una considerada alta, que provoca una suspensión temporal evidente del crecimiento tras realizarse el choque osmótico, (400 mM de NaCl y 700 mM de sacarosa) y otra baja, capaz de provocar un retraso en el crecimiento del cultivo en tolerancia pero que no producía una importante variación en respuesta a un choque (300 mM de NaCl y 500 mM de sacarosa). Los cambios en expresión génica con respecto a las condiciones control, se han estudiado a los 15, 30, 60 y 240 minutos tras la aplicación del choque osmótico.

Los 16 experimentos descritos se realizaron por triplicado obteniéndose de esta forma los correspondientes datos de intensidad, variación de la expresión respecto al control y fiabilidad para cada gen descrito en el genoma de *S. meliloti*, considerándose como diferencialmente expresados aquéllos que tenían valores de M superiores a 2 ó inferiores a -2. Los genes finalmente seleccionados se estudiaron según su agrupación en replicones, características funcionales, rutas metabólicas y operones. Las diferencias en la respuesta a un choque osmótico de distinta naturaleza o intensidad así como su evolución a lo largo del tiempo se pueden poner de manifiesto mediante esta técnica ya que permite un estudio global del transcriptoma en cada una de las condiciones estudiadas.

SII-4

Importancia de la biosíntesis de trehalosa en la capacidad de osmoadaptación y eficiencia simbiótica de *S. meliloti*.

Pérez-Arnedo, R.*, Domínguez-Ferreras, A., Soto, M.J., Olivares, J., y Sanjuan, J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
**rebeca.perez@eez.csic.es*

La trehalosa es un disacárido reconocido como un eficiente osmoprotector en diversos organismos. En las bacterias conocidas globalmente como *Rhizobium,* aún no se conoce qué papel juega la acumulación de este compuesto durante la adaptación a estrés osmótico o en la simbiosis con leguminosas trehalosa. Se ha demostrado que la mayoría de los rizobios poseen dos rutas diferentes de síntesis de trehalosa [(1)]. Una de ellas, es la ruta presente en la mayoría de organismos, que implica la formación de trehalosa-6-fosfato a partir de UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato, reacción catalizada por una trehalosa-6-fosfato sintasa. Esta proteína está codificada por el gen *otsA* en *Escherichia coli*. La trehalosa-6-fosfato es posteriormente convertida en trehalosa libre por una trehalosa-6-P fosfatasa, codificada por el gen *otsB*. La segunda ruta de biosíntesis de trehalosa presente en *Rhizobium* parte de maltooligosacáridos, lo que implica la acción de dos enzimas, maltooligosil trehalosa sintasa (MOTS) y maltooligosil trehalosa trehalohidrolasa (MOTTH).

El análisis de la secuencia del genoma de *S. meliloti* revela la presencia de un gen *otsA* (trehalosa 6-fosfato sintasa), localizado en el plásmido simbiótico pSymA, pero no de *otsB*. No obstante posee un gen que codifica para una posible trehalosa fosfatasa, además de genes que probablemente codifican las enzimas MOTS y MOTTH.

Con el objetivo de determinar si existe una correlación entre la capacidad de adaptación de *S. meliloti* a estrés osmótico en condiciones de vida libre y su capacidad para sintetizar trehalosa, se ha llevado a cabo la construcción de mutantes simples en genes que participan en cada una de las rutas de biosíntesis de trehalosa (*otsA* y *mots*) así como de mutantes dobles, derivados de las cepas GR4 y 1021 de *S. meliloti*. Se presentará la capacidad de osmoadaptación de estos mutantes así como su fenotipo simbiótico. Adicionalmente, se ha estudiado la expresión de los genes *otsA* y *mots* mediante la construcción de fusiones de las regiones promotoras al gen reportero *gus* en distintas condiciones relacionadas con la acumulación de trehalosa.

[1]Streeter et al., (1999), Can. J. Microbiol. 45:716-721

SII-5

Caracterización del gen *pgi* en la simbiosis *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa.

Oliva-García, J.J.[1]*, van Dillewijn, P.[2], Sanjuan, J.[1], Olivares, J.[1], y Soto, M.J.[1]

[1]Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, [2]Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
**jjoliva@eez.csic.es*

Las bacterias conocidas globalmente como *Rhizobium* se caracterizan por su capacidad para establecer simbiosis mutualista con plantas leguminosas. Aunque el resultado de dicha interacción es un beneficio mutuo para los dos organismos, sorprende el hecho de que genes bacterianos importantes para la virulencia de microorganismos patógenos, tengan también un papel clave en la simbiosis *Rhizobium*–leguminosa.

El gen *pgi* codifica una fosfoglucoisomerasa (PGI), enzima capaz de catalizar la isomerización reversible de glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato. Además de desempeñar un papel esencial en glucolisis y gluconeogénesis, se han atribuído funciones adicionales a este gen. En la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris*, el gen *pgi* se ha demostrado ser importante para la virulencia de la bacteria [(1)]. En mamíferos, además de ser un enzima citosólico de la glucolisis, también funciona como una citoquina extracelular (Neuroleuquina/factor de maduración/AMF) habiendo sido implicada en supervivencia de neuronas, diferenciación, y siendo secretada por ciertos tumores, promueve migración celular *in vitro* y metástasis *in vivo* [(2)].

La secuencia del genoma de *S. meliloti* revela la existencia de 3 genes que potencialmente podrían codificar proteínas con actividad PGI. Mientras la proteína codificada por SMc02163 muestra las características de una PGI clásica, con una secuencia muy similar a la de eucariotas (55% identidad), las codificadas por SMb20857 y SMc02042 son proteínas más pequeñas homólogas a las PGI tipo arquea (40% identidad). SMc02163 se halla ligado a *fadD*, cuya implicación en el establecimiento de simbiosis y regulación de migración multicelular (swarming) ha sido demostrada por nuestro grupo [(3)]. Hemos comprobado que SMc02163 codifica una PGI. Los intentos de conseguir un mutante en este gen *pgi* mediante intercambio alélico, y probando distintos medios de selección con objeto de aliviar posibles deficiencias metabólicas, han sido infructuosos. El intercambio alélico sólo es posible cuando la bacteria dispone de una copia *pgi* en *trans*, lo que sugiere que este gen es esencial en las condiciones de laboratorio ensayadas. Sí ha sido posible obtener un mutante *pgi* llevando a cabo transfección de *S. meliloti* 1021 con el fago φM12 y seleccionando en LB. La implicación de este gen en el establecimiento de simbiosis con plantas de alfalfa y en la aparición de swarming, así como las condiciones que regulan su expresión se presentarán en este trabajo.

[1]Tung and Kuo (1999) App. Environ. Microbiol. 65: 5564-5570
[2]Chou et al. (2000) J. Biol. Chem. 275: 23154-23160
[3]Soto et al. (2002) Mol. Microbiol. 43: 371-382

SII-6

Control coordinado de motilidad y propiedades simbióticas en *Sinorhizobium meliloti* mediado por VisNR.

Soto, M.J[1]*, Scharf, B.[2†], Schmitt, R. [2†], Sanjuan, J.[1], y Olivares, J.[1]

[1]Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
[2]Lehrstuhl für Genetik, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie, Universität Regensburg, 93040, Regensburg, Alemania.
**soto@eez.csic.es*

En diversas bacterias que establecen asociaciones patogénicas se ha podido constatar la existencia de una estrecha conexión entre control de la motilidad, expresión de factores de virulencia y capacidad de establecer asociación con el hospedador. En enterobacterias, uno de los elementos que juegan un papel clave en dicho control coordinado es el regulador de la clase I del regulón flagelar FlhDC, que no sólo regula la formación y control de rotación de los flagelos, sino que también es capaz de regular la expresión de factores de virulencia [(1)]. Resultados obtenidos en nuestro laboratorio, sugieren que también en *S. meliloti*, una bacteria que establece simbiosis mutualista con plantas leguminosas, existe un control coordiando de motilidad y factores importantes para la simbiosis [(2)].

Al igual que en enterobacterias, los operones del regulón flagelar de *S. meliloti* se agrupan en 3 clases mayoritarias, estando su expresión regulada de forma jerárquica [(3)]. Los genes de la clase I, *visNR*, que codifican proteínas del tipo LuxR, son imprescindibles para la expresión de los genes del regulón flagelar, y por tanto para la motilidad de la bacteria. En este trabajo hemos investigado la posible funcionalidad de VisNR como regulador global en *S. meliloti*, analizando el fenotipo simbiótico de mutantes VisN, VisR y VisNR, así como la expresión de genes importantes para la simbiosis (*nod, exp*) en estos fondos genéticos. Tenemos evidencias que sugieren que la motilidad no es importante ni para la infectividad ni la capacidad competitiva de la bacteria. No obstante, un mutante VisNR muestra una reducción significativa en su capacidad competitiva con respecto a la cepa silvestre. El hecho de que esta mutación conlleva la sobre-expresión de genes implicados en síntesis de galactoglucano, sugiere que en *S. melilioti* VisNR podría funcionar como un regulador global que participa en la regulación coordinada de motilidad y expresión de factores importantes para la simbiosis.

[†]Acción Integrada HA20020071

[1]Fraser and Hughes (1999) Curr. Opin. Microbiol. 2: 630-635
[2]Soto et al. (2002) Mol. Microbiol. 43: 371-382
[3]Sourjik et al. (2000) J. Bacteriol. 182: 782-788

SII-7

Caracterización molecular y funcional de proteínas HupE en *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae.

Brito, B.[1] , Cabrera, E.[1]*, Palacios, J.M.[1], Imperial, J.[1,2], y Ruiz-Argüeso, T.[1]

[1]Departamento de Microbiología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, [2]Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.) Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.
**ecabrera@bit.etsia.upm.es*

En simbiosis con leguminosas, algunas bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* son capaces de inducir un sistema de oxidación de hidrógeno que permite reciclar el hidrógeno generado en el proceso de fijación biológica de nitrógeno.

El sistema de oxidación de hidrógeno (sistema *hup*) de *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae UPM791 se compone de 18 genes. De ellos, *hupS* y *hupL* codifican las subunidades estructurales de la hidrogenasa, mientras que los genes *hupCDEFGHIJKhypABFCDEX* determinan proteínas con funciones implicadas en el ensamblaje de las subunidades estructurales o en la captación e incorporación de metales en el centro activo del enzima [3]. Dentro de la agrupación de genes *hup* de *R. leguminosarum*, *hupE* codifica una proteína particularmente interesante. Su presencia sólo se ha descrito en los sistemas *hup* de *Methylococcus capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Azorhizobium caulinodans*. Su similitud con UreJ, un componente del sistema de síntesis de la ureasa de *Bordetella bronchiseptica* [2], permite postular para HupE un papel como transportador de níquel específico de la hidrogenasa.

Ensayos previos realizados con un mutante afectado en el gen *hupE* de *R. leguminosarum* no demostraron diferencias significativas en los niveles de actividad hidrogenasa en simbiosis. El análisis de la secuencia genómica de *R. leguminosarum* 3841 ha revelado la presencia de un gen con una elevada similaridad con *hupE*. El clonaje y secuenciación de la misma región de la cepa UPM791 ha permitido la identificación de un gen, denominado *hupE2,* cuyo producto deducido presenta un 50% de identidad con *hupE.* Se han generado mutantes simples y dobles en *hupE* y *hupE2* en la cepa UPM791 y tambien en la cepa SPF25, una cepa modificada para la expresión microaeróbica del sistema hidrogenasa [1]. El empleo de este sistema ha revelado que la interrupción de los genes *hupE* y *hupE2* reduce significativamente los niveles de actividad hidrogenasa en microaerobiosis. La actividad hidrogenasa se restaura por adición de níquel el medio, lo que sugiere un papel para HupE en el transporte o incorporación de níquel en la hidrogenasa.

[1]Brito, B., Imperial, J., Palacios, J.M. and Ruiz-Argüeso, T. (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68:2461-2467.
[2]McMillan, D.J., Mau, M. and Walker, M.J. (1998) Gene 208, 243-251.
[3]Ruiz-Argüeso, T., Imperial, J. and Palacios, J.M. (2000) (Triplett, E.W., Ed.), pp. 489-507 Horizon Scientific Press, Wymondham, UK.

SII-8

Caracterización molecular de hidrogenasas en *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) y *Azorhizobium caulinodans*.

Baginsky, C.[1] , Imperial, J.[1,2], Ruiz-Argüeso, T.[1], Palacios, J.M.[1], y Brito, B.[1]*

[1]Departamento de Microbiología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, [2]Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.) Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid.
**bbrito@bit.etsia.upm.es*

La capacidad de oxidación de hidrógeno desarrollada por bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en nódulos de leguminosas se ha descrito como una estrategia efectiva para la mejora de la eficiencia energética del proceso de fijación biológica de nitrógeno [3]. Sin embargo, el carácter Hup (*h*ydrogen *up*take) no está ampliamente distribuido en la familia *Rhizobiaceae*. Así, la frecuencia de cepas Hup^+ es elevada en el género *Bradyrhizobium* [5], mientras que el sistema *hup* es poco frecuente en *Rhizobium, Sinorhizobium, Azorhizobium* y *Mesorhizobium* [2, 4].

Trabajos previos nos han permitido caracterizar la composición y variabilidad de las secuencias de los genes *hup* en cepas de *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*), *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*), *Azorhizobium caulinodans*, *Azorhizobium* sp. y *Rhizobium tropici* [1]. En este análisis, las agrupaciones de genes *hup* de *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) y *Azorhizobium caulinodans* resultaron ser particularmente interesantes desde el punto de vista biológico y aplicado.

La caracterización molecular del sistema *hup* en *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) ha revelado la existencia de una agrupación génica compuesta por los genes *hupSLCDFGHJKhypABFCDE*. Esta organización es muy similar a la descrita para la agrupación de genes *hup* localizada en la isla simbiótica de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. La construcción de un mutante afectado en los genes estructurales *hupSL* condujo a la inactivación del sistema de oxidación de hidrógeno en bacteroides de plantas de *Vigna unguiculata*. Esta mutación se correlacionó con reducciones significativas en la actividad nitrogenasa de los nódulos y en el contenido de nitrógeno de las plantas.

El análisis molecular del sistema hidrogenasa de *Azorhizobium caulinodans* ORS571 permitió identificar una agrupación integrada por los genes *hupTUVhypFhupSLCDFGHJKhypABhoxAhypCDEhupE*. Su organización es similar a la descrita en *Rhodobacter capsulatus* con la excepción del gen *hupE*. La inactivación de los genes *hupSL* provocó una drástica reducción de la capacidad de oxidación de hidrógeno en bacteroides procedentes de plantas de *Sesbania rostrata*. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas asociadas a dicha mutación en los valores de actividad nitrogenasa, materia seca y contenido de nitrógeno en estas plantas.

[1]Baginsky, C., Brito, B., Imperial, J., Palacios, J.M. y Ruiz-Argüeso, T. (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68, 4915-4924.
[2]Navarro, R.B., T., V.A.A., Schroder, E.C. y Van Berkum, P. (1993) Appl. Environ. Microbiol. 59, 4161-4165.
[3]Maier, R.J. y Triplett, E.W. (1996) Crit. Rev. Plant Sci. 15, 191-234.
[4]Ruiz-Argüeso, T., Hanus, F.J. y Evans, H.J. (1978) Arch. Microbiol. 116, 113-118.
[5]Schubert, K.R. y Evans, H.J. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1207-1211.

SII-9

Análisis funcional del operón *hupGHIJ* en la síntesis de la hidrogenasa por *R. leguminosarum* bv. viciae.

Manyani, H.[1]*, Rey, L., Imperial, J.[1,2], y Ruiz-Argüeso, T. [1]

[1]Unidad de Microbiología. Dpto. Biotecnología. ETSI Agrónomos Universidad Politécnica de Madrid, [2]C S I C. Ciudad Universitaria s/n 28040-Madrid.
**hamid@bit.etsia.upm.es*

La síntesis de la hidrogenasa [FeNi] de *Rhizobium leguminosarum* UPM791 es un complejo proceso que requiere una agrupación génica que contiene18 genes. El operon *hupGHIJ* forma parte de esta agrupación y se expresa en vida libre de la bacteria bajo el control del promotor P3 [(1)]. Con el fin de investigar la función de cada uno de estos genes en el proceso de biosíntesis de la hidrogenasa se han generado mutantes no polares en cada uno de ellos, y se ha determinado su efecto en la actividad y procesamiento de la enzima. Este análisis ha permitido obtener las siguientes conclusiones.

a) Los genes hupG, hupH, hupI y hupJ son necesarios para alcanzar niveles salvajes de actividad hidrogenasa, siendo mas relevantes en vida libre de la bacteria que en bacteroides de guisantes.
b) El procesamiento de la subunidad grande (HupL) de la hidrogenasa, requerido para su funcionalidad, no fue afectado en ninguno de los mutantes *hupGHIJ*, sugiriendo una posible implicación de estos genes en el proceso de síntesis de la subunidad pequeña (HupS).
c) La esencialidad del gen hupG para la actividad hidrogenasa de la bacteria en vida libre decrece al disminuir la concentración de oxígeno en el medio de cultivo. Este resultado sugiere que la proteina HupG desempeña un papel protector de la síntesis de HupS frente al oxígeno. No se ha observado efecto detectable del oxígeno en la actividad hidrogenasa asociada a los mutantes hupH, hupI y hupJ en el rango de concentraciones ensayadas.

[1]Martinez M, Brito B, Imperial J, Ruiz-Argüeso T. (2004) Characterization of a new internal promoter (P(3)) for Rhizobium leguminosarum hydrogenase accessory genes hupGHIJ.. Microbiology. 150 (Pt 3):665-75.

SII-10

Los genes *motR* y *motS* controlan la motilidad y determinan la competitividad en *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae UPM791

Martínez, M. [1], Capdevila, S., Cabrera, E. [1], Ruiz-Argüeso, T. [1], e Imperial, J. [1, 2*]

[1]Departamento de Biotecnología, Unidad de Microbiología, [2] Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid
**jimperial@bit.etsia.upm.es*

Los genes *motR* y *motS* de *R. leguminosarum* bv. viciae se localizan en una región cromosómica de 70 kb que agrupa los genes de motilidad, quimiotaxis y formación de flagelos. Las proteínas codificadas por *motR* y *motS* pertenecen a la familia de reguladores transcripcionales de tipo LuxR ya que contienen un dominio conservado hélice-giro-hélice de unión a ADN en su extremo C-terminal. Esto plantea la posibilidad de que MotR y MotS sean reguladores de autoinducción ("quorum sensing") que responden a la presencia de acil homoserina lactonas. Los genes *motR* y *motS* son homólogos entre sí y aparecen formando parte del mismo operón *motRS,* al igual que los genes *visNR* homólogos en *Sinorhizobium meliloti.*

Con el propósito de determinar la funcionalidad de MotR y MotS de la cepa UPM791, ambos genes fueron aislados y secuenciados, y se generaron mutantes delecionando en el genoma cada uno de ellos individualmente *(ΔmotR, ΔmotS)* y los dos a la vez *(ΔmotRS)*. Todos los mutantes presentaban una pérdida total de motilidad. A fin de determinar la competitividad de las cepas resultantes se inocularon plantas de guisante con inóculos que contenían la cepa silvestre marcada con el gen *gusA* y cada uno de los mutantes de deleción en proporción 10:1, 1:1 y 1:10, repectivamente. Los resultados obtenidos en este análisis indican que la cepa silvestre es mucho más competitiva que cualquiera de los mutantes, y ello tanto en colonización de la raíz como en formación de nódulos.

Dada la homología de MotR y MotS con los reguladores de motilidad, quimiotaxis y formación de flagelos VisN y VisR de *S. meliloti* se decidió estudiar el posible papel regulador de MotR y MotS sobre el mismo conjunto de genes, así como su autorregulación tanto en vida libre como en simbiosis. Para ello, por una parte se crearon fusiones transcripcionales genómicas con el gen delator *lacZ* en los genes *motS, motA, motBC* y *fla*, y se determinó la actividad β-galactosidasa en el fondo silvestre, en el fondo silvestre al que se le había añadido un plásmido que expresaba la enzima lactonasa, y en los mutantes *ΔmotS* y *ΔmotRS*. Por otro lado, se determinó la expresión, por medio de RT-PCR, de los genes *motR, motS, motA, motC, fla* y *reg* en los fondos silvestre, silvestre con lactonasa, y mutantes *ΔmotR, ΔmotS y ΔmotRS*. Los resultados obtenidos condujeron a las siguientes conclusiones: a) los genes *motRS* se expresan a bajos niveles en vida libre y apenas se expresan en simbiosis; b) MotRS no intervienen en la regulación del promotor del operón *motRS;* c) la expresión de los genes *motA, motBC, fla* y *reg* depende directa o indirectamente de MotR y de MotS, y esta expresión también adquiere valores bajos en vida libre y es casi inexistente en simbiosis; d) La expresión de *motRS* y de todos los genes controlados por sus productos génicos no se ve afectada por la presencia de lactonasa, lo que sugiere que ninguna acil homoserina lactona es reconocida por los reguladores MotRS ni por los productos de los genes que activan.

SII-11

Análisis proteómico de *Rhizobium leguminosarum* bv viciae en respuesta a la regulación por "quorum sensing".

Cantero, L.[1]*, Marugán, V.[1], Palacios, J.M. [1], Ruiz-Argüeso, T.[1], e Imperial, J.[1,2]

[1] Departamento de Biotecnología, Unidad de Microbiología, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid.
[2] Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
** laura.cantero@bit.etsia.upm.es*

Rhizobium leguminosarum UPM791 es portadora de cuatro plásmidos nativos, y produce al menos cinco moléculas señal distintas del tipo acil-homoserin lactonas (AHLs) encargadas de la regulación génica dependiente de densidad celular ("quorum sensing"). En esta cepa hemos demostrado la presencia de los genes *cinI*, *rhiI* y *traI* que codifican para sintasas de AHLs. Los sistemas *rhi* y *tra* están codificados en el plásmido simbiótico (pUPM791c) y el sistema *cin* en el cromosoma. Sin embargo, y a diferencia de lo observado en otra cepa de *Rhizobium leguminosarum* A34[(1)], en UPM791 la síntesis de la AHL mediada por CinI (bacteriocina *small;* 3-OH-$C_{14:1}$-HSL) es independiente de la presencia del plásmido simbiótico; además, en esta cepa la síntesis de esta bacteriocina *small* es absolutamente dependiente de la presencia del plásmido pUPM791d.

Con el fin de identificar genes regulados por "quorum sensing" en las cepas UPM791 y 3841, se ha llevado a cabo un estudio proteómico (2D-PAGE) empleando cepas portadoras del gen *aiiA* que codifica una lactonasa de *Bacillus subtilis*. La expresión de dicha lactonasa provoca un fuerte descenso en los niveles de todas las AHLs, en especial en la cepa 3841. Los análisis de expresión diferencial han revelado que la supresión de las moléculas señal origina variaciones significativas en los niveles de expresión de una fracción apreciable del total de proteínas celulares. Mediante técnicas de espectrometría de masas (MALDI-TOF) se están identificando algunas de las proteínas cuya variación es más significativa. Así, se ha demostrado que la expresión de RhiA, una proteína mayoritaria en condiciones de rizosfera, es totalmente dependiente de la presencia de AHLs activas en la célula. Otras proteínas cuya expresión es estrictamente dependiente de la presencia / ausencia de AHLs en la célula están siendo analizadas en la actualidad.

[1]Lithgow, J.K., A Wilkinson, A. Hardman, B.Rodelas, F. Wisniewski-Dye, P Williams, and J.A. Downie. 2000. The regulatori locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. Mol. Microbiol. 37 : 81-97

SII-12

El sistema Tat (Twin Arginine Translocation) de exportación de proteínas afecta a los estadíos vegetativo y simbiótico de *Rhizobium leguminosarum* bv viciae.

Rey, L.*, Meloni, S. , Ruiz-Argüeso, T., y Palacios, J. M.

Dpto. Biotecnología, Unidad de Microbiología, E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Universidad Politécnica. Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid.
**lrey@bit.etsia.upm.es*

Las bacterias exportan fuera de su citoplasma hasta un 20% de las proteínas que sintetizan. Algunas de las proteínas que se destinan al periplasma previamente adquieren una conformación espacial parcial o completa en el citoplasma incorporando frecuentemente cofactores metálicos. La translocación de estas proteínas no puede hacerse mediante el sistema general de secreción o sistema Sec sino que requiere un sistema, el sistema Tat, capaz de translocar proteínas con una conformación plegada [(1)].

En nuestro laboratorio estamos estudiando la importancia del sistema Tat en *Rhizobium leguminosarum* bv viciae. Con este objetivo se ha clonado y secuenciado el sistema Tat que codifica las proteínas TatABC y se ha generado un mutante *tatBC*. El mutante presentó un fenotipo fuertemente pleiotrópico, reflejo del elevado número de proteínas de esta especie que presentan un péptido señal característico de las proteínas dependientes del sistema Tat [(2)].Se ha demostrado que el mutante deficiente en el sistema Tat no tiene actividad ubiquinona oxidoreductasa ni actividad respiratoria dependiente de citocromo *c*; el mutante tampoco es capaz fijar nitrógeno en simbiosis con guisantes. Estas deficiencias podrían ser debidas a la incapacidad de sintetizar un complejo bc_1 funcional, un complejo esencial en la respiración de los bacteroides vía citocromo cbb3 [(3)]. Sin embargo, la utilización de cepas de *Rhizobium* que expresan constitutivamente la proteína verde fluorescente (GFP) ha revelado que el mutante *tat* no es capaz de colonizar la region central de los nódulos, a diferencia de lo que ocurre en nódulos de cepas deficientes específicamente en el complejo bc_1. Esto indica que el mutante *tat* está afectado además en los estadios iniciales de la simbiosis. En estos momentos se está analizando el papel de proteínas con péptido señal de tipo TAT potencialmente implicadas en la síntesis de envueltas celulares.

[1] Berks, B. C., F. Sargent et al. (2000). The Tat protein protein export pathway. Mol Microbiol 35: 260-274
[2] Meloni, S., L. Rey et al. (2003). The twin-arginine translocation (Tat) system is essential for Rhizobium legume symbiosis. Mol Microbiol 48: 1195-207
[3] Wu, G., M.J. Delgado, et al., (1996) The cytochrome bc_1 complex but not CycM is necessary fo symbiotic nitrogen fixation by *Rhizobium leguminosarum*. Microbiology 142:3381-8

SII-13

Aspectos moleculares y fisiológicos de diferentes variedades de *Medicago truncatula* sometidas a estrés salino.

de Lorenzo, L. [1*], Merchán, F.[1,2], Crespi, M.[2], Megías, M.[1], y Sousa, C.[1]

[1.]Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla, 41080 Sevilla, España.
[2] Institut des Sciences du Végétal, Centre National de la Recherche Scientifique, F-91198 Gif-sur-Yvette, Francia.
**laura_lynx@hotmail.com*

El estudio de los perfiles de expresión se ha convertido en una importante herramienta para investigar cómo un organismo responde a cambios ambientales. Las plantas, como organismos sensibles al estrés abiótico, tienen la capacidad de adaptar su transcriptoma en respuesta a cambios en dichas condiciones.

El estrés ambiental, tanto la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas, la toxicidad química y el estrés oxidativo son serias amenazas a la agricultura y al estatus natural del medioambiente. El aumento de la salinización en los terrenos cultivables, se espera que produzca una devastación global resultante de una pérdida del 30% de cultivos en los próximos 25 años. Este problema está creando una presión para mejorar la tolerancia de las plantas al estrés salino.

Las leguminosas, son interesantes candidatos para mejorar la fertilidad en suelos salinos, debido a su capacidad de crecer en suelos pobres en nitrógeno mediante su interacción simbiótica con bacterias del género *Rhizobium* (1).

El estudio de esta limitación ambiental sobre la leguminosa modelo *Medicago truncatula* y la determinación de diferencias fisiológicas y transcripcionales que existen entre distintas variedades de ésta (con diferente tolerancia a estrés salino), nos ha permitido definir un rango de tolerancia a la salinidad entre diferentes cultivares de *M. truncatula*, entre los que se encuentra R108, Jemalong, F83, DZA45.5 y DZA315.16.

La influencia de la salinidad sobre la interacción simbiótica de estas plantas con los rizobios es de gran importancia para efectividad de la fijación de nitrógeno, es por ello que se llevaron a cabo estudios de nodulación entre los distintos cultivares sometidos a este estrés ambiental.

Asimismo, el análisis de los niveles de expresión de una serie de genes inducibles por sal, en las distintas variedades de *M. truncatula* nos definieron las respuestas tolerantes o sensibles de estos cultivares al estrés salino. Estos perfiles de respuesta de la planta al estrés abiótico son expectativas que nos acercarán a mejorar la tolerancia al estrés ambiental, así como para determinar nuevas herramientas para estudiar los circuitos de regulación a nivel genético.

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por el proyecto nº HF2001.0120. L. de Lorenzo y F. Merchán son becarios F.P.U. del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

[1]Crespi, M. y Gálvez, S. 2000. *J. Plant Growth Reg*. 19, 155-166.

SII-14

Estudio del transcriptoma de *Medicago truncatula* en respuesta al estrés salino.

Merchán, F.[1, 2]*, de Lorenzo, L.[1], Frugier, F.[2], Megías, M.[1] , Sousa, C.[1], y Crespi, M.[2].

[1] Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.
[2] Institut des Sciences du Végétal, C.N.R.S., F-91198 Gif-sur-Yvette, France.

El cultivo de leguminosas al igual que otros, presenta grandes pérdidas debidas a la salinidad del suelo. El estudio del efecto de este factor limitante sobre estas plantas, por su capacidad de nodular y fijar nitrógeno, presenta gran interés *per se* y aun más si a este se le aplican nuevas técnicas de estudio. En nuestro laboratorio hemos definido para *Medicago truncatula* (leguminosa modelo) la tolerancia a NaCl y el punto de no-recuperación de plantas estresadas en condiciones de laboratorio. Tras analizar diferentes tiempos de tratamiento con sal (150 mM), hemos constatado que plantas de *M. truncatula* 108R estresadas durante 7 días no son capaces de recuperar los daños causados (menos del 5%) mientras que un tratamiento de 4 días permite la recuperación al 75% de las plantas. Por otro lado se ha identificado un factor de transcripción, *Mtzpt2-1,* inducido en nódulos y durante el estrés salino en raíces [(1,2)]. Las plantas que expresan este gen en antisentido se recuperan peor tras un estrés salino que las plantas control, lo que sugiere la implicación de este gen en la capacidad de recuperación de *M. truncatula*.

Para intentar identificar el programa transcripcional inducido por el estrés salino en el que pueda estar implicado el gen *Mtzpt2-1,* nos hemos propuesto estudiar el transcriptoma de *M. truncatula* utilizando las plantas antisentido *Mtzpt2-1,* microarrays 6K, dos bancos SSH y un macroarrays "dedicado" con genes seleccionados por su inducción y represión por NaCl. Los análisis realizados, centrados en la raíz de la planta, nos han permitido identificar 320 genes: de los cuales 11 son factores de transcripción, 106 son homólogos a genes secuenciados en Arabidopsis y 13 presentan homología con genes ya relacionados con estrés abiótico (http://www.plantstress.com/admin/Files%5CAbiotic-stress_gene.htm). Además, se desconocen completamente 52 de los genes identificados y 72 parecen ser específicos de leguminosas. Todo esto sugiere una nueva vía transcripcional asociada a la respuesta a estrés abiótico en *M. truncatula*.

Este trabajo ha sido financiado con una beca FPU para Francisco Merchán y Laura de Lorenzo, y el programa Picasso franco-español.

[1]Merchan F., Breda C., Hornaeche J.P., Sousa C., Kondorosi A. Aguilar O.M., Megias M. and Crespi, M. 2003. A Krüppel-like transcription factor gene is involved in salt stress responses in *Medicago* ssp. Plant and Soil 257, 1-9.

[2]Frugier F., Poirier S., Satiat-Jeunemaître B., Kondorosi A. and Crespi M. 2000. A Krüppel-like zinc finger protein is involved in nitrogen-fixing root nodule organogenesis. Genes Dev. 14, 475-482.

SII-15

Regulación de genes de quimiotaxis en *Rhizobium leguminosarum*.

Del Bel, K.L.[1], Yost, C.K.[2], y Hynes, M.F.[1,3] *

[1]Department of Biological Sciences, University of Calgary, Calgary AB, Canada T2N 1N4,
[2]Department of Biology, University of Regina, Canada
[3]Estacion Experimental del Zaidín, CSIC, Prof Albareda 1, 18008 Granada
** hynes@ucalgary.ca*

Rhizobium leguminosarum es una bacteria conocida por su interacción simbiótica con varias plantas como guisante, trébol, lenteja, y haba. En nuestros laboratorios, estamos estudiando la respuesta quimiotáctica de *R. leguminosarum* y su papel en la vida de la bacteria en el suelo, en la rizosfera y en la simbiosis. Cepas de *R. leguminosarum* poseen un familia muy grande de genes que codifican quimiorreceptores del tipo MCP (methyl-accepting chemotaxis proteins) [(1,2)]. Algunos de los genes *mcp* tienen un papel en la capacidad competitiva de la bacteria por la nodulación de guisante [(1)], aunque la función fisiológica de la mayoría de los genes *mcp* se desconoce en la actualidad.

Para estudiar la regulación de los genes *mcp*, se construyeron fusiones *lacZ* y *gusA* de los genes *mcpB*, *mcpC*, y *mcpD*. La expresión de las fusiones en condiciones de vida libre demostró ser siempre bastante alta, mientras que en condiciones simbióticas se encontró un descenso en la expresión de entre 5 y 10 veces. La regulación negativa de las fusiones *mcp* en los nódulos resultó independiente de genes reguladores tales como *fnrN*, *fixK* y *fixL*, así como de la concentración de oxígeno. El empleo de anticuerpos contra la región conservada de proteínas MCP y contra proteínas del complejo flagelar también confirmaron que la expresión de genes de quimiotaxis disminuye en nódulos.

Con el fin de buscar posibles genes reguladores de quimiotaxis, se construyeron cepas con fusiones *mcpD::gusA* y *mcpC::gusA* integradas en el genoma de *R. leguminosarum*. Se realizó una mutagénesis al azar de ambas cepas, para la búsqueda de mutantes donde las fusiones no se expresaran en vida libre (colonias blancas sobre medio con xGluc) y mutantes donde no se produzca represión de la expresión de las fusiones en nódulos (nódulos azules después de teñir con xGluc). En este trabajo se presenta la identificación y caracterización de mutantes de ambos tipos, así como su interacción con la planta leguminosa.

[1] Yost, C.K., Rochepeau, P., and Hynes M.F. (1998*) Rhizobium leguminosarum* contains a group of genes that appear to code for methyl accepting chemotaxis proteins. Microbiology 144:1945-1956.

[2] Yost C.K., Clark, K.T, Del Bel, K.L., and Hynes M.F. (2003) Characterization of the nodulation plasmid encoded chemoreceptor gene *mcpG* from *Rhizobium leguminosarum*. BMC Microbiology 3:1

SII-16

Regulación de la desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*.

Robles, E. F.[1], Bonnard, N.[2], Bueno, E.[1], Molinero, N.[1], Delgado, M.J.[1], y Bedmar, E.J.[1]*

[1]Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Apartado Postal 419, 18080 Granada.
[2]Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg, Zellbiologie und Angewandte Botanik, Kart-von-Frisch-Str. 8, D-35032 Marburg, Germany.
**ejbedmar@eez.csic.es*

Bradyrhizobium japonicum es una bacteria clave en el ciclo del N en la biosfera ya que participa en los procesos de fijación del dinitrógeno atmosférico (N_2), tanto en vida libre como en simbiosis, y en los de asimilación del nitrato y de desnitrificación. Este último se lleva a cabo por la acción secuencial de las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa (Nir), óxido nítrico reductasa (Nor) y óxido nitroso reductasa (Nos), codificada por los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX*, respectivamente. Aunque la expresión de los genes de la desnitrificación, determinada mediante fusiones transcripcionales entre los genes *nirK-lacZ* y *norC-lacZ* requiere condiciones limitantes de oxígeno, la máxima expresión se obtiene cuando concurren, de manera simultánea, la ausencia de oxígeno y la presencia de nitrato, o de un óxido derivado. En condiciones limitantes de oxígeno, la expresión de los genes *nirK* y *norC* está controlada por el sistema FixLJ-$FixK_2$. FixLJ es un sistema regulador de dos componentes en el que FixL es una hemoproteína capaz de reconocer la concentración intracelular de oxígeno y activar el gen *fixJ*, cuyo producto es un regulador de respuesta que activa, a su vez, al gen *$fixK_2$*. La proteína $FixK_2$ es un activador transcripcional de la familia FNR/CRP que se une a las denominadas regiones de anaerobiosis presentes en la región promotora de los genes de la desnitrificación y activa su transcripción. Por otra parte, se ha demostrado que, en presencia de nitrato, la proteína NnrR, que también se incluye en la familia FNR/CRP, es necesaria para la máxima expresión de los genes *nirK* y *norC*. Las cepas de *B. japonicum* mutadas en *nnrR* son incapaces de crecer micraeróbicamente con nitrato y carecen de actividad nitrato y nitrito reductasa. Sin embargo, el óxido de nitrógeno, NO_3 , NO_2^-, NO o N_2O, que induce la expresión del gen *nnrR* es desconocida. Los estudios de immunodetección de la proteína NapA, así como los de deteción de citocromos *c* y de expresión de actividad β-galactosidasa en cepas alteradas en los genes *napA*, *nirK*, *norC* y *nnrR*, sugieren la existencia de dos circuitos de regulación en *B. japonicum*, uno mediado por NO y otro por nitrito/nitrato.

Este trabajo se ha subvencionado con los Proyectos CICYT BMC2002-04126-C03-02, PROFIT, FIT050000-2001-30 y la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación CVI-275.

SII-17

Factores relacionados con el control de la expresión en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* Z25 de una bacteriocina que guarda similitud con las toxinas de la familia RTX.

Mora, L.[1], Rodelas, B.[1], y González-López, J.[1, 2*]

[1]Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, e [2]Instituto del Agua, Universidad de Granada, 18071 Granada.
**jgl@ugr .es*

Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* cepa Z25 (CECT 4585) produce una bacteriocina activa frente a cepas de *Rhizobium* estrechamente relacionadas, una característica que puede cumplir un importante papel en la competición por la nodulación de la planta huésped. Cuatro mutantes de la cepa Z25 defectivas en la producción de bacteriocinas se construyeron en un estudio previo, mediante mutagénesis al azar con Tn5 (1). La clonación y secuenciación de las regiones que flanquean las inserciones de Tn5 reveló similitud con genes estructurales que codifican proteínas de la familia RTX de toxinas.

La bacteriocina producida por la cepa Z25 se expresa a partir de un operón (*rzcCADEF*) localizado en un megaplásmido de 360 Mda, y abarca una región de 18 Kb que porta los genes necesarios para la activación post-traduccional (*rzcC*), producción de la pro-bacteriocina (*rzcA*), y su transporte mediante un sistema de secreción de tipo I (*rzcDE*). La proteína RzcA de la cepa Z25 muestra la mayor similitud (80% de media en la región C-terminal) con la proteína RzcA de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* cepa 162Y10 (2).

Las toxinas RTX se regulan con frecuencia a nivel de la transcripción mediante varios factores que actúan tanto en *cis* como en *trans*. El análisis de las fusiones transcripcionales muestra que los genes del operón *rzc* se expresan igualmente en *E. coli* DH5α, aunque los perfiles de expresión son diferentes en los fondos genéticos de Z25 y DH5α. El posible papel de las acil-homoserina-lactonas (AHLs) en la regulación de la expresión de bacteriocina ha sido investigado en la cepa Z25. Mediante cromatografía en capa fina de extractos obtenidos del sobrenadante de cultivos de la cepa Z25, y tras el revelado con la cepa indicadora *Agrobacterium tumefaciens* NTL4 pZLR4, se detecta un mínimo de 5 moléculas inductoras, algunas de las cuales migran a la altura de AHLs estándar con ácidos grasos de cadena corta (C_6 y C_8). Sin embargo, de manera relativamente inesperada, la cepa Z25 es incapaz de activar la producción del pigmento violaceína por la cepa indicadora *Chromobacterium violaceum* CV026. Se han clonado y secuenciado en la cepa Z25 homólogos de los genes *cinRI*, responsables del control principal de los mecanismos de percepción de quórum (*quorum sensing*) en otras cepas de *R. leguminosarum* (3). Aunque la mutación en el gen *cinI* no afecta al fenotipo de nodulación, sí reduce la liberación de bacteriocina, en comparación con la cepa silvestre.

El trabajo de L. Mora y B. Rodelas ha sido financiado mediante ayudas de los Programas FPU (MECD) y Ramón y Cajal (MCYT), respectivamente.

[1]Rodelas B et al. (2000) 4th ENFC, Sevilla, Spain, p.298.
[2]Venter AP et al. (2001) *Can. J. Microbiol.* 47: 495
[3]Lithgow JK et al. (2000) *Mol. Microbiol.* 37:81.

SII-18

Análisis funcional del tmRNA de *Sinorhizobium meliloti* en vida libre y en simbiosis.

Lloret, J.[1,2]*, Rivilla, R.[2], y Walker, G. C.[1]

[1]Department of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA02139, USA.
[2]Departamento de Biología Universidad Autónoma de Madrid, 28049Madrid.
**javier.llorets@uam.es*

El tmRNA (trasfer-messenger RNA) es un ARN de pequeño tamaño que probablemente está presente en todas las Eubacterias y cuya estructura presenta características tanto de ARNs mensajeros como transferentes, en especial el de la alanina, aminoácido que generalmente es incorporado en este ARN. Ejerce su actividad en un proceso denominado *trans*-traducción, por el cual los ribosomas atascados por ARNs mensajeros defectuosos o que ralentizan la traducción, son liberados del ribosoma por el tmRNA para solucionar problemas durante la síntesis proteica. De un modo no determinado el tmRNA reconoce los ribosomas atascados y se introduce en el sitio A, incorporando la alanina al polipéptido en formación, como cualquier otro tRNA. Posteriormente el tmRNA se traslada al sitio P y, de manera aún desconocida, expulsa el mRNA y lo substituye por su ORF interna, que codifica para una serie de aminoácidos no polares. Esta cola de aminoácidos es reconocida por diversas proteasas celulares para la degradación del péptido que se estaba formando. En α-proteobacterias y algunas cianobacterias el tmRNA difiere del resto al estar compuesto por dos moléculas de ARN que adoptan una estructura similar al tmRNA de una sola pieza. Esto se debe a que en estas bacterias el gen ha sufrido una permutación circular, por lo que el trascrito primario debe ser procesado y cortado para dejar libre el extremo donde se incorporará la alanina. A pesar del importante papel jugado por esta molécula, solamente se ha descrito como esencial en unas pocas especies, aunque ha sido implicado en virulencia en bacterias patógenas.

En las Rhizobiáceas el tmRNA fue descrito en *Bradyrhizobium japonicum* mucho antes de conocerse su función. Un mutante en dicho gen presentaba una ligera disminución en la tasa de crecimiento e inducía nódulos prácticamente vacíos con una bajísima capacidad fijadora de nitrógeno.

El análisis que hemos llevado a cabo del tmRNA en *Sinorhizobium meliloti*, nos ha permitido determinar que la función de liberar ribosomas atascados es esencial para la célula. Por otro lado, se han generado distintas versiones de la ORF interna, mediante mutagénesis dirigida, para generar colas no reconocidas por las proteasas celulares y así evitar la rápida degradación de los péptidos en formación. Se analizará la importancia de esta función durante la simbiosis, así como del posible papel que juega el tmRNA durante el cambio de vida saprofita a simbiótica.

SII-19

Factores sigma de función extracitoplasmática en *S. meliloti*: aproximación transcriptómica y proteómica.

Oruezabal, R.I.[1]*, Jofre, E.[2], Mora, M.[1], Lloret, J.[1], Becker, A.[3], y Rivilla, R.[1]

[1]Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid.
[2]Departamento de Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina
[3]Departamento de Genética. Universidad de Bielefeld. Alemania
**roke.oruezabal@uam.es*

Los factores sigma bacterianos constituyen un componente esencial de la ARN polimerasa y determinan la selección de la expresión de distintos genes. Diversos factores sigma juegan papeles cruciales en la coordinación de la transcripción de distintos genes de respuesta a condiciones de estrés y durante el desarrollo morfológico. Los factores sigma de función extracitoplasmática (ECFs) responden a señales externas mediante sus respectivos factores anti-sigma localizados en la membrana bacteriana. *Sinorhizobium meliloti* 2011 presenta en sus dos megaplásmidos cinco ECFs ; rpo, rpoE5, rpoE6, sig y SMb20531. Tras realizar experimentos de expresión de sus promotores y ensayos de supervivencia de cada uno de los mutantes, se seleccionaron cuatro de estos mutantes (todos excepto sig$^-$) para realizar un análisis de expresión mediante el uso de microarrays bajo distintas condiciones de stress, asimismo y de forma complementaria se analizó el proteoma completo mediante electroforesis bidimensional de tres de estos mutantes (rpoE5$^-$, rpoE6$^-$ y SMb20531$^-$) para dilucidar las diferencias de expresión entre los mutantes y la cepa salvaje durante fase estacionaria.

En los datos obtenidos de los de microarrays se observa una regulación mayoritaria de genes codificantes de proteínas caracterizadas como posibles e hipotéticas en la anotación de la secuencia del genoma completo de *S. meliloti*, abundando las localizadas en la membrana plasmática y apareciendo algunos posibles reguladores transcripcionales pertenecientes a varias familias. Los resultados de proteómica más interesantes correspondieron al mutante rpoE6$^-$ con diferencias apreciables en siete proteínas de variadas funciones identificadas por MALDI-TOF (respuesta a estrés y de función periplásmica fundamentalmente) de las cuales 2 se corroboraron por las comparativas de microarrays, SMa0104 y SMa1082.

SII-20

Modificación de la expresión génica por niveles de B y Ca durante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas.

Redondo-Nieto, M.[1-2]*, Bolaños, L.[1], Mergaert, P.[2], Maunoury, N.[2], Kondorosi, E.[2], y Bonilla, I.[1]

[1]Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid.
[2]Institute des Sciences du Vegetal, CNRS, 91198 Gif sur Yvette.
** Miguel.Redondo-nieto@isv.cnrs-gif.fr*

Las leguminosas crecidas en deficiencia de boro (B) desarrollan pocos nódulos simbióticos que son, además, no funcionales. Sin embargo, una adición extra de calcio (Ca) puede recuperar parcialmente los problemas causados por la deficiencia. Con el fin de detectar una relación entre estos efectos de B y Ca con diferentes niveles de expresión de genes implicados en la simbiosis, se llevaron a cabo estudios mediante técnicas de macroarrays y RT-PCR. Así, mediante los macroarrays se pudo detectar un incremento general en la expresión génica en nódulos de plantas deficientes en B, que se recupera total o parcialmente en algunos genes con la adición de Ca. Entre ellos cabe destacar nodulinas como la leghemoglobina presentan una sobreexpresión, lo cual con el fenotipo pálido del nódulo deficiente en B, indicando una ausencia total de la proteína. Por su parte, genes relacionados con la arquitectura de la pared celular también se vieron alterados por la deficiencia de B. La adición de Ca, si bien recuperó la expresión de secuencias que codifican enzimas como la quitinasa y la celulosa sintasa, no tuvo efectos sobre la expresión de genes estructurales como las proteínas ricas en prolina y glicina.

La anatomía de los nódulos indeterminados depende de la actividad meristemática. La deficiencia de B produjo una alteración de genes reguladores del ciclo celular, implicados en la regulación de la transición G1-S, como son la *ciclina D3*, *Rb* y *E2F*, también recuperados por Ca. Aunque otras *cdks* (*cdc2MsD* y *cdc2MsF*) mantuvieron la sobreexpresión en deficiencia de B aun con suplementos de Ca, mientras que *cdc2MsE*, *cdc2* y *cdc48* presentaron una expresión reducida comparada a la de nódulos control. Algunos de ellos se estudiaron en mayor profundidad usando RT-PCR. Así, *cycD3* mostró una sobreexpresión en deficiencia de B que comenzaba antes de la inoculación con *Rhizobium*, cuando en plantas control comienza 10 h tras la inoculación. Sin embargo, otros genes, como *histona H3* y *E2F* no mostraron diferencias durante el estudio. Los macroarrays también mostraron una alteración en la expresión de *ccs52* en nódulos deficientes, recuperada por Ca. Este gen, responsable de fenómenos de endoreduplicación, se expresa en el meristemo y en la zona II, preparando a las células para la acumulación de bacteroides, mientras que su expresión desaparece en células ya invadidas. La sobreexpresión que presentan los nódulos deficientes se mantienen durante toda la vida de los mismos, la cual podría estar relacionado con la mínima invasión que presentan estos nódulos y su recuperación por Ca^{2+}.

Por tanto, prácticamente todos los efectos de distintos niveles de B y Ca^{2+} sobre el desarrollo del nódulo, tienen un reflejo en la expresión de genes responsables de la interacción simbiótica.

SII-21

Estudio transcriptómico de la respuesta de *Sinorhizobium meliloti* ante la presencia y actividad de retrointrones.

Molina-Sánchez, M.D.[1]*, Barrientos-Durán, A.[1], Martínez-Abarca, F.[1], Rüberg, S.[2], Becker, A.[2,3], y Toro, N.[1]

[1]Grupo de Ecología Genética de la Rizosfera, Departamento de Microbiologíadel Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
[2]Lehrstuhl für Genetik, [3]Institut für Genomforschung, Universität Bielefeld, D-33615 Germany.
**mdmolina@eez.csic.es*

Recientemente se ha llevado a cabo la secuenciación completa de la cepa referencia 1021 de *Sinorhizobium meliloti*. Asociado a este hecho se han desarrollado ADN microarrays como nuevas herramientas para el estudio sistemático de la expresión de los genes presentes en esta bacteria. Se basa en la impresión sobre un portaobjetos de vidrio de oligonucleótidos (a elevada densidad) que representan los 6207 marcos abiertos de lectura identificados tras la secuenciación de la cepa referencia, recibiendo la denominación de ADN microarrays *Sm*6koligo [(1)].

RmInt1 es el primer intron del grupo II encontrado en el orden Rhizobiales, más concretamente fue descrito por nuestro grupo en la cepa GR4 de *Sinorhizobium meliloti* [(2)]. Este elemento genético es abundante en el genoma de la bacteria y parece estar mayoritariamente asociado a otro elemento genético móvil, la secuencia de inserción IS*Rm2011-2*. Por su parte, RmInt1 es también un elemento móvil independiente capaz de insertarse en sitios específicos a una alta frecuencia, proceso que se conoce con el término de *retrohoming* (ya que se ha descrito que su movilidad está mediada por un intermediario ARN), así como en sitios heterólogos a una frecuencia inferior, proceso conocido como transposición[(3)]. Ambos procesos suceden en ausencia de recombinación homóloga[(4)] y estudios recientes parecen indicar que se encuentran asociados a replicación [(5)].

La expresión y actividad de este tipo de elementos desde plásmidos multicopia genera determinadas actividades implicadas en su proceso de movimento entre las que destacan actividad reverso transcriptasa, endonucleasa, etc. La presencia de este tipo de actividades enzimáticas puede dar lugar a variaciones en la expresión de determinados genes en el hospedador. Con objeto de caracterizar estas variaciones se plantea el estudio transcriptómico mediante ADN microarrays del efecto de la presencia de las formas activas de los intrones del grupo II. Estudios preliminares validan el uso de los DNA microarrays *Sm*6koligo para hospedadores distintos a la cepa referencia 1021. A ese respecto, se dispone de datos procedentes de dos fondos genéticos: RMO17, donde el intrón se describe 100% activo, y 1021, fondo en el que el intrón ha demostrado tener una eficiencia disminuida [(6)]. Estos estudios apuntan a que el conjunto de genes expresados diferencialmente por la presencia de intrones activos oscila entre 50-60, predominando los genes cuya función se encuentra sin determinar.

[1] Rüberg *et al.*, 2003. *J. of Biotechnology*, 106; 255-268.
[2] Martínez-Abarca *et al.*, 1998. *Mol. Microbiol.*, 28; 1295-1306.
[3] Muñoz *et al.*, 2001. *Mol. Microbiol.* 41; 645-652.
[4] Martínez-Abarca y Toro, 2000. *Nucleic Acids Res.* 28; 4397-4402.
[5] Martínez-Abarca *et al.*, *NAR* submitted.
[6] Toro *et al.*, 2003. *Mol. Gen. Genomics*, 268; 628-636.

SII-22

Clonación y expresión del gen que codifica para trehalasa en *Medicago truncatula*.

Herrera-Cervera, J.A.*, López, M., Tejera N.A., y Lluch, C.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n, 18071 Granada.
**jahc@ugr.es*

La trehalosa es un disacárido (α-D-glucopiranosil α-D-glucopiranósido), reconocido como un eficiente osmoprotector en diversos organismos. Este disacárido no abunda en plantas vasculares, excepto en dos especies de Angiospermas tolerantes a la desecación (las llamadas plantas resurrección), aunque la enzima que hidroliza la trehalosa, la trehalasa, sí se ha encontrado en distintos tejidos y órganos vegetales de diversas especies vegetales, a pesar de su aparente carencia de substrato [2]. La utilización de la trehalosa como agente protector ante determinados estreses ambientales ha desencadenado en los últimos años la obtención de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Solanum tuberosum*, entre otras especies, que sobreexpresan genes microbianos procedentes de *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae* involucrados en la síntesis de trehalosa.

A diferencia del resto de la planta, la trehalosa es muy abundante en nódulos de leguminosas presentando una alta actividad trehalasa [1]. Es posible que la trehalosa producida por el microsimbionte sea la inductora de la alta actividad trehalasa del nódulo. El mecanismo por el cual la trehalosa y/o la actividad trehalasa actúa como agente protector ante los procesos de estrés es desconocido. Está bien establecido en la bibliografía que los bacteroides de *Rhizobium* acumulan trehalosa en diferentes cantidades dependiendo de la especie bacteriana. Aunque no ha sido demostrado, se supone que son los propios bacteroides quienes sintetizan esta trehalosa, parte de la cual es además excretada al citosol vegetal. Por tanto, la liberación de la trehalosa del bacteroide se podría postular como un "determinante simbiótico". Ambas, trehalosa y trehalasa, podrían tener un papel regulador del metabolismo carbonado en plantas. Más aún, se ha sugerido que la trehalosa bacteroidal pueda jugar un papel importante en la translocación de sustratos carbonados al nódulo, a través de su influencia en la actividad trehalasa vegetal. En este trabajo se pretende abordar el clonaje del gen que codifica para la enzima trehalasa en la leguminosa modelo *Medicago truncatula*. Una vez conocida su secuencia parcial, se pretende analizar su expresión en diferentes tejidos vegetales, tales como raíces, nódulos, hojas o flores, mediante la técnica de RT-PCR. Como referencia, se determinará la expresión de genes (ubiquitina) que son expresados de forma constitutiva en todos los tejidos o de genes de expresión específica (enod40). Utilizando la secuencia parcial del gen de trehalasa de *M. truncatula* disponible en los bancos de EST, se han diseñado cebadores específicos que han permitido la amplificación de un fragmento de 780 bp cuya secuencia se corresponde con genes de trehalasa. Las implicaciones de la expresión del dicho con serán discutidas en el presente trabajo.

Este trabajo ha sido financiado por el MCYT gracias al proyecto BOS2002-04182-C02-02 y a la Junta de Andalucía a través del grupo AGR-139.

[1] J. Müller, A. Wiemken, R. Aeschbacher, Plant Science (1999), 147: 37-47
[2] J. Müller, Z.P. Xie, C. Staehelin, R. B. Mellor, T. Boller y A. Wiemken, Physiologia Plantarum (1994), 90: 86-92

SII-23

Del tubo polínico al cordón de infección: reclutamiento de los genes pécticos de polen de *Medicago* para la simbiosis.

El Mounadi, K.[1], Pérez-Hormaeche, J.[1], Dary, M.[1], Caviedes, M.A.[1], Ratet, P.[2], Palomares, A.J.[1], y Rodríguez-Llorente, I.D.[1]*

[1]Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla.[2] Institut des Sciences du Végétale, Centre National de la Recherche Scientifique, 91198 Gif sur Yvette Cedex, France.
** irodri@us.es*

Las bases genéticas y moleculares de la formación del nódulo han sido y son actualmente objeto de estudio por parte de numerosos grupos de investigación, sin embargo, poco sabemos sobre los eventos evolutivos que han llevado a las leguminosas a establecer la simbiosis con los rizobios. Hemos estudiado la presencia y la expresión de dos familias de genes pécticos en *Medicago* que se expresan en las primeras etapas de la interacción *S. meliloti-Medicago*, las poligalacturonasas (PGs) y las pectin metilesterasas (PMEs), y las hemos comparado con genes de las mismas familias expresados en polen. En primer lugar hemos comparado la expresión de *MsPG3,* un gen de poligalacturonasa que se expresa de forma específica durante la simbiosis, con la expresión de *MsPG11*, un gen específico de polen muy homólogo al anterior. La expresión de fusiones de los promotores de ambos genes al gen *gus* en plantas de *M. truncatula* y de tabaco sugiere que el promotor simbiótico se comporta como un promotor de polen en tabaco. En segundo lugar hemos identificado en *Medicago* la presencia de una familia génica de PMEs de al menos 8 genes expresados de forma diferencial. Una subfamilia está representada por un gen simbiótico (*MtPER*) y dos genes expresados en polen (*MtPEF1* and *MtPEF2*), los tres presentes en un cluster en el genoma de *M. truncatula*. Los análisis de expresión en plantas transgénicas y la homología entre las PGs vegetales, junto con el análisis de la estructura del locus de PME y la expresión de *MtPER*, sugieren que los genes simbióticos *MsPG3* y *MtPER* podrían tener como ancestros genes expresados en polen, que están implicados en los procesos de crecimiento polar apical que tienen lugar durante la elongación del tubo polínico. Más aún, podrían haber sido reclutados, tras una duplicación génica, para la interacción simbiótica con objeto de facilitar los procesos de crecimiento polar apical que tienen lugar durante la formación y crecimiento del cordón de infección.

Sesión III.

Reconocimiento e interacción planta-microorganismo:
Rhizobium-*leguminosa, micorrizas, actinorrizas, PGPRs.*

SIII-P1

Reconocimiento e integración funcional entre simbiontes en micorrizas arbusculares.

Ferrol, N.*, Barea, J.M., y Azcón-Aguilar, C.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
**nferrol@eez.csic.es*

Las micorrizas arbusculares son asociaciones simbióticas mutualistas que se establecen entre ciertos hongos microscópicos del suelo y la mayoría de las plantas existentes en la superficie de la corteza terrestre. El hongo coloniza biotróficamente la corteza de la raíz, llegando a ser parte integrante de la misma, a partir de la cual desarrolla un micelio extenso que, a modo de sistema radical complementario y altamente efectivo, ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales y agua del suelo. A su vez, la planta le suministra al hongo, simbionte estricto, los compuestos carbonados que éste necesita para completar su ciclo de vida, así como un nicho ecológico protegido. Las micorrizas son tan antiguas como las propias plantas. Actualmente se acepta que la estrategia seguida por los antecesores de las plantas actuales para superar los problemas inherentes del paso de un medio acuoso al terrestre fue la asociación con hongos del suelo que les ayudara en la absorción de nutrientes y agua, estableciéndose así las primeras micorrizas. Desde entonces esta simbiosis, que se considera la pionera de entre las simbiosis microbio-planta conocidas, ha desempeñado un papel clave en la superviviencia de las plantas y en el reciclaje de nutrientes en el ecosistema.

El establecimiento y funcionamiento de las micorrizas requiere de un diálogo molecular continuo entre ambos simbiontes que permita el reconocimiento mutuo y la regulación de su desarrollo. El carácter de simbiontes obligados de los hongos formadores de micorrizas, junto con la dificultad de aislar las estructuras intraradicales de los mismos, ha limitado la elucidación de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la simbiosis. Actualmente se desconoce la naturaleza de las moléculas señal implicadas en la comunicación entre la planta y el hongo, aunque ya se han identificado algunos de los componentes de la ruta de transducción de señales requerida para el establecimiento de la simbiosis, algunos de los cuales son comunes a los requeridos para la formación de la simbiosis *Rhizobium*/leguminosa.

El funcionamiento de las micorrizas arbusculares depende, en gran medida, de la capacidad del micelio externo de absorber nutrientes minerales del suelo y transferírselos a la planta a cambio de carbohidratos. La identificación y caracterización de los genes que codifican las proteínas responsables del movimiento de los nutrientes en la simbiosis está permitiendo dilucidar los mecanismos moleculares que rigen la integración funcional de ambos simbiontes. Estos estudios se han centrado en el análisis de la regulación y localización de transportadores primarios (H^+-ATPasas) y secundarios de la planta y del hongo, habiéndose comprobado que tanto la absorción de fosfato por las hifas externas del hongo, como por la planta a nivel de la interfase simbiótica, ocurre por procesos de transporte activo. Sin embargo, aún se desconocen los procesos por los cuales se produce la transferencia de los compuestos carbonados de la planta al hongo y de aquéllos que determinan la biotrofía de los hongos formadores de micorrizas arbusculares.

SIII-P2

Caracteres bacterianos implicados en la colonización de la rizosfera.

Martín, M., y Rivilla, R*.

*Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. *rafael.rivilla@uam.es*

La colonización de la rizosfera es la primera etapa en múltiples interacciones simbióticas entre microorganismos y plantas, siendo el proceso de colonización crítico para un correcto establecimiento de la simbiosis. Hasta hace pocos años se consideraba que la colonización era un proceso sencillo, dirigido por una mayor abundancia de nutrientes en el suelo rizosférico que en el resto del suelo. Sin embargo, varios estudios han demostrado la implicación de numerosos caracteres bacterianos en el proceso de colonización. Para estudiar estos caracteres y su relevancia durante la colonización, se están empleando diversas tecnologías entre las que destacan el estudio de genes bacterianos que se expresan diferencialmente en la rizosfera, mediante IVET (In Vivo Expresión Technology) y aproximaciones genómicas y estudios de colonización competitiva de mutantes obtenidos al azar y mediante mutagénesis dirigida. Estos estudios han permitido identificar funciones bacterianas importantes para la colonización de la rizosfera y han demostrado que la capacidad de colonización afecta de forma decisiva a procesos biotecnológicos derivados de interacciones simbióticas.

En esta ponencia se discutirán algunas de las estructuras y funciones bacterianas que han mostrado implicación en la colonización de la rizosfera, como adaptación a un metabolismo diferente y a nuevos estreses, movilidad, quórum sensing, reordenaciones genómicas, secreción de proteínas y componentes estructurales de la superficie bacteriana y se plantearán posibles estrategias para mejorar el proceso de colonización y con ello las aplicaciones biotecnológicas de las interacciones simbióticas entre plantas y bacterias.

SIII-1

Relación causa/efecto entre mutación en genes simbióticos y resistencia a la micorrización y nodulación.

García Garrido, J.M.*, Herrera Medina, M.J., Morales Vela, G., Tamayo Navarrete, M.I., y Ocampo Bote, J.A.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, C/ Profesor Albareda, 1, 18008 Granada.
**jmgg@eez.csic.es*

La existencia de plantas leguminosas mutantes afectadas tanto para el proceso de nodulación (Nod-) y fijación de N_2 (Fix-), como para el proceso de formación de la micorriza arbuscular (Myc-), ha permitido establecer una serie de etapas genéticamente identificadas y comunes en ambas simbiosis mutualistas. Se han caracterizado fenotípicamente dichos mutantes, correlacionando la mutación con la afectación de procesos citológicos típicos en el establecimiento de cada una de las asociaciones simbióticas [1].

Estudios realizados con plantas mutantes Nod-/Myc- inoculados con hongos arbusculares han puesto de manifiesto una reacción con connotaciones de defensa por parte de la planta, que reacciona acumulando fenoles y material de reforzamiento de su pared celular [2], así como acumulando ácido salicílico [3], una molécula señal de respuesta defensiva en plantas.

Nuestras investigaciones se centran en el estudio de la acumulación de ácido salicílico y expresión de genes simbióticos y genes de patogénesis (PR) en las interacciones compatibles e incompatibles, debido a mutación en genes simbióticos, de plantas de Pisum sativum con microorganismos simbiontes. Los resultados que se presentan muestran la expresión del gen de nodulina temprana ENOD12 asociada solo al fenotipo silvestre inoculado, tanto en experimentos de nodulaciòn (inoculación con Rhizobium leguminosarum) como de micorrización. Por otra parte, la expresión del gen de defensa PI206 aparece asociada fuertemente a la interacción hongo de la micorriza arbuscular con mutante simbiótico y de forma más débil a la interacción con Rhizobium, es decir interacciones incompatibles. Estudios de aplicación de SA en raíces de plantas silvestres y mutantes muestran una relación de la expresión PI206 con la acción del SA. Los resultados obtenidos nos permiten concluir que la incompatibilidad por mutación en los genes sym30 y sym19 se manifiesta, según nuestros estudios, en un incremento en los niveles de ácido salicílico producido por la raíz, y la expresión de genes de patogénesis regulados por dicho compuesto, y se requiere un correcto funcionamiento de los genes Sym30 y Sym19 para modular la respuesta defensiva de la planta frente a hongos arbusculares, permitiendo la colonización y el establecimiento de la simbiosis mutualista.

[1] Guinel F.C and Geil R.D. 2002. Can. J. Bot. 80: 695-720.
[2] Gollote et al., 1993. Planta 191: 112-122.
[3] Blilou et al., 1999. J. Exp. Bot 50: 1663-1668.

SIII-2

Efectos del B sobre glucoproteínas de la membrana peribacteroidea en simbiosomas de nódulos de leguminosas.

Bonilla, I.[1]*, Redondo-Nieto, M.[1,2], Pulido, L.[1], y Bolaños, L.[1]

[1]Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid.
[2]Institute des Sciences du Vegetal, CNRS, 91198 Gif sur Yvette.
** ildefonso.bonilla@uam.es*

Durante el desarrollo del nódulo simbiótico en leguminosas, los rizobios endofíticos, tras la invasión celular, proliferan y se diferencian a forma fijadora de N_2 o bacteroide, rodeados por una membrana peribacteroidea (MPB) de origen vegetal, que expone hacia el bacteroide un glucocálix, cuyos componentes son regulados durante el proceso de diferenciación. Entre ambos existe un fluido peribacteroideo (FPB) que contiene, entre otros, glucoproteínas específicas, como PsNLEC-1A y 1B, posibles lectinas procedentes del Aparato de Golgi que son secretadas al FPB durante el proceso de maduración del bacteroide. Las leguminosas crecidas en deficiencia de boro (B) desarrollan pocos nódulos simbióticos que son, además, no funcionales. En ellos, las bacterias liberadas al interior de la célula huésped se diferencian anormalmente, dando lugar a simbiosomas aberrantes, en los que las bacterias endofíticas permanecen como formas inmaduras y no fijadoras de N_2. Además, la MPB pierde la sincronía de división, de tal forma que una membrana rodea a varias bacterias.

El análisis inmunológico de componentes implicados en la maduración de simbiosomas en nódulos de guisante, nos ha llevado a establecer que las formas simbiosomales PsNLEC-1A y –1B, se encuentran anormalmente glucosiladas en células de nódulos deficientes en B. Además, estas formas anormales de PsNLEC no son dirigidas al FPB, permaneciendo acumuladas en el citoplasma, indicando un problema en la fusión de vesículas procedentes del Aparato de Golgi en nódulos deficientes en B. El uso de anti-RGII, un anticuerpo utilizado para localizar el componente péctico rhamnogalacturonano II, molécula que ancla B como estabilizador de la arquitectura de la pared celular, nos ha permitido localizar un(os) antígeno(s) de naturaleza glucoproteica que se expresa(n) fuertemente en la MPB de simbiosomas en desarrollo, y, de forma débil en simbiosomas maduros. En membranas simbiosomales de nódulos deficientes de B no existe expresión. En principio, en geles de poliacrilamida, el componente glucídico de al menos tres bandas glucoproteicas son reconocidas por anti-RGII, que también aparecen en fracciones de tejidos no infectados, tanto de raíz como de tallo. A falta de un análisis más profundo, estas glucoproteínas aparecerían implicadas en la maduración de simbiosomas. Además, puesto que en deficiencia de B existen problemas con la fusión de vesículas y la liberación de su contenido en los puntos diana, como demuestra la ausencia de las glucoproteínas PsNLEC-1A y-1B durante las maduración de simbiosomas, o la menor presencia de rhamnogalacturonano II en la pared de células deficientes de B, estas glucoproteínas podrían ser responsables del correcto anclaje y/o posterior fusión de vesículas.

SIII-3

Interacciones planta-*Rhizobium* mediadas por glucoconjugados durante la infección del nódulo y el desarrollo de simbiosomas.

Bolaños, L.[1]*, Rivilla, R.[1], Redondo-Nieto, M.[1], Brewin, N. J.[2], y Bonilla, I.[1]

[1]Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid.
[2]Department of Genetics, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH. Gran Bretaña.
** luis.bolarios@uam.es*

Durante el desarrollo del nódulo simbiótico, la integración física y metabólica entre *Rhizobium* y las células huésped deviene progresivamente más íntima. Las bacterias deben adaptarse para sobrevivir en un ambiente endofítico sin disparar mecanismos de defensa en la planta. Evidencias genéticas y citológicas indican la importancia de polisacáridos de la superficie bacteriana y glucoconjugados de la planta en la determinación de una relación simbiótica y no patogénica. Así, mutantes *exo*, defectuosos en la síntesis de espolisacárido (EPS), bien no forman nódulos o los forman vacíos, ya que no inducen la formación y/o elongación de canales de infección. Mutantes en lipopolisacárido (LPS) inducen nódulos, si bien con canales de infección desarrollados, vacíos o con invasión celular reducida, indicando un papel del LPS en el proceso de endocitosis. Además, en los últimos, las bacterias endofíticas se diferencian a bacteroides aberrantes. Por su parte, durante el proceso de infección, la planta secreta material glucoproteico al lumen del canal de linfección; durante el desarrollo de los simbiosomas, la membrana peribacteroidea adquiere un glucocálix con glucoproteínas y glucolípidos regulados por desarrollo; asímismo, aparecen algunas glucoproteínas, como las posibles lectinas PsNLEC-1A, 1B de guisante, en el fluido peribacteroideo. Todos estos componentes glucídicos podrían estar implicados en interacciones físicas con la superficie celular de *Rhizobium* que dirigirían el normal desarrollo de la simbiosis. Así, leguminosas mutantes en algunos de estos componentes, presentan nódulos con formas no diferenciadas de bacteroides.

El uso de anticuerpos específicos nos ha permitido demostrar *'in vitro'* la existencia de interacciones entre estos componentes. Una glucoproteína secretada por la planta al canal de infección tiene capacidad para unirse a la superficie de *Rhizobium* y otras bacterias, impidiendo una posterior interacción con la membrana de la célula a invadir que inhibiría el proceso de endocitosis. La presencia de una cápsula exopolisacarídica protege a la bacteria de dicha interacción. La membrana peribacteroidea también interacciona físicamente con la superficie bacteriana, siendo la interacción mucho más íntimamente mediada por los glucolípidos del glucocálix que por las glucoproteínas. Estos glucolípidos se inducen en las células invadidas, por lo que su papel fundamental podría ser mantener esta íntima asociación entre bacteroides, cuyo LPS se torna más hidrofóbico que el de la forma de vida libre, y célula huésped. Por último, las formas simbiosomales glucosiladas PsNLEC-1A y 1B, pero no la forma citoplasmática preglucosilada 1C, interaccionan con el Antígeno-O del LPS de *Rhizobium*, sugiriendo que en esta interacción radica la importancia de dichas glucoproteínas y polisacárido para la maduración de bacteroides, ya que anomalías en estos compoentes glucídicos la alteran.

SIII-4

¿Son capaces determinados rizobios de inducir resistencia sistémica en *Arabidopsis thaliana*?

Ramos Solano, B.[1]*, Doménech Manteca, J.[1], Pereyra de la Iglesia, M.T.[1], Megías Guijo, M.[2], y Gutierrez Mañero, F. J.[1]

[1]Departamento de CC. Ambientales y RR. Naturales, Universidad San Pablo CEU,
[2]Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.
** bramsol@ceu.es*

La supervivencia de una planta frente al ataque de un agente patógeno ocurre mediante dos mecanismos defensivos fundamentales: resistencia sistémica adquirida y resistencia sistémica inducida. En este último caso un microorganismo no patógeno o determinados agentes químicos son capaces de evitar la infección del patógeno [(1)].

El fenómeno de inducción de resistencia sistémica fue definido por van Loon y su equipo en el sistema modelo *A.thaliana* colo, *Pseudomonas syringae* WSC417r y el patógeno *Pseudomonas syringae* DC3000 [(1)]. En este modelo la bacteria inductora de resistencia sistémica, *P.syringae* WSC417r, aplicada en el sistema radical de *A.thaliana* es capaz inducir el metabolismo defensivo de la planta, disminuyendo los síntomas de enfermedad cuando se aplica el patógeno foliar *P.syringae* DC3000. La inducción de resistencia sistémica se ha descrito en varias especies vegetales como *Nicotiana tabacum* y *Lycopersicon sculentum* entre otras, y es característica de cada sistema vegetal (planta-patógeno-bacteria inductora)

La potencial incidencia de este fenómeno en los sistemas de producción agrarios ha incentivado la búsqueda de bacterias capaces de inducir resistencia sistémica así como la validación del fenómeno en otras especies vegetales. Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal PGPRs [(2)] y las bacterias simbióticas como los rizobios son buenas candidatas a ejercer su mecanismo beneficioso induciendo el metabolismo defensivo de la planta, dada su larga historia coevolutiva de relación con vegetales.

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad de inducción de resistencia sistémica de 4 rizobios, 2 cepas de *Rhizobium* (*Rhizobium phaseoli* ISP42 *y Rhizobium tropici* CIAT 899) y 2 cepas de *Sinorhizobium* (*S.fredii* HH103 y *S.fredii* SMH12) en *A.thaliana* para comprobar si son capaces de disminuir la incidencia de la enfermedad provocada por *P.syringae* DC3000. En caso afirmativo, se evaluará si su mecanismo de acción va asociado a una inducción de la sensibilidad frente a etileno, y cómo se ven afectados los niveles de salicílico en planta, ya que en el sistema modelo estos dos parámetros se consideran como buenos indicadores del mecanismo de acción de la bacteria PGPR.

[1]Van Loon et al, 1998. *Ann Rev Phytopathol* 36: 453-483
[2]Kloepper and Schroth, 1978. Proc. 4th Intl. Conf. Plant Pathogenic Bacteria 879-882

SIII-5

La acidez modifica los factores de nodulación liberados por *Rhizobium tropici* CIAT899.

Morón, B.[1]*, Soria-Díaz, M.E.[2], Verroios, G.[3], Noreen, S.[3], Rodríguez-Navarro, D.N.[4], Gil-Serrano, A.[2], Thomas-Oates, J.[3], Megías, M.[1], y Sousa, C.[1]

[1]Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, [2]Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, [3]Department of Chemistry, Universisty of York, [4]CIFA Las Torres-Tomejil, Sevilla.

La interacción simbiótica rizobio-leguminosa culmina con la formación de un nuevo órgano en la raíz de la planta, denominado nódulo. En el interior del mismo se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno, proceso gracias al cual se transforma el nitrógeno atmosférico en compuestos fácilmente asimilables por la planta. La gran complejidad del proceso involucra la expresión coordinada de genes tanto en la bacteria como en la planta. En respuesta a compuestos liberados por las plantas (flavonoides, betaínas y ácidos aldónicos), los rizobios sintetizan otras señales específicas, los factores Nod, dirigidos hacia la planta hospedadora. Estos compuestos bacterianos son moléculas señal con un papel fundamental en el inicio del desarrollo del nódulo y en la invasión bacteriana [(1)].

Los rizobios en el suelo están expuestos a diversas condiciones medioambientales adversas, entre las que destaca la acidez del suelo. El establecimiento de la simbiosis y, por lo tanto, la formación de nódulos fijadores de nitrógeno están afectados negativamente por el bajo pH del suelo y factores asociados a él [(3)]. *Rhizobium tropici* CIAT899 es una cepa muy tolerante a distintos estreses abióticos, tales como pHs extremos, salinidad y altas temperaturas. Asimismo, es un simbionte capaz de nodular numerosas leguminosas, característica que se relaciona con el amplio espectro de factores Nod que libera [(2)].

El objetivo de este trabajo fue el estudio de los efectos de la acidez sobre la biosíntesis de los factores Nod por *R. tropici* CIAT899, así como su influencia sobre el establecimiento de una simbiosis efectiva. Con el fin de establecer el rango de tolerancia a pHs extremos, se determinó el crecimiento de esta cepa en medio tamponado a distintos pHs (tampones inorgánicos y orgánicos), comprobándose que era capaz de crecer entre 4,5 y 8,5/9,0. Por otro lado, cuando la cepa crece en medio ácido, secreta mayor cantidad de factores Nod en comparación con los que se liberan a pH neutro. Además, bajo estas condiciones se liberan nuevos factores Nod no descritos hasta la fecha en *R. tropici* CIAT899 y que están ausentes cuando la bacteria crece a pH neutro.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto de INCO-DC (CEE) nº ERBIC18 CT980321, por el proyecto de CICYT nº PB98-1116 y por el proyecto IFD97-1430-C04-03.

[1]D'Haeze, W., and M. Holsters. 2002. *Glycobiol.* 12: 79-105.

[2]Folch-Mallol, J. L., S. Marroquí, C. Sousa, H. Manyani, I. M. López-Lara, K. M. G. M. van der Drift, J. Haverkamp, C. Quinto, A. Gil-Serrano, J. Thomas-Oates, H. P. Spaink, and M. Megías. 1996. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 151-163.

[3]Zahran, H. H. 1999. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 968-989.

SIII-6

Construcción de cepas híbridas de *Rhizobium* que nodulan en *Phaseolus vulgaris*: Estudio de la fijación biológica del nitrógeno atmosférico.

Gamane, D.[1]*, Camacho, M.[2], Dardanelli, M.S.[1], Megías, M.[1], y Sousa, C.[1]

[1] Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad de Sevilla. Sevilla. España.
[2] C.I.F.A. "Las Torres-Tomejil". Junta de Andalucía. Sevilla. España.
**djami@us.es*

Las leguminosas o fabáceas constituyen una familia muy numerosas de árboles, arbustos o hierbas con gran variedad en su tamaño. Está constituido por 674 géneros y entre 16.000 y 19.000 especies. Presentan una distribución cosmopolita encontrándose repartidas por las regiones templadas, tropicales y subtropicales. Las leguminosas tienen una enorme importancia económica para el hombre ya que se utilizan para el consumo humano y del ganado, o como abono verde para Agricultura sostenible.

La judía (*Phaseolus vulgaris*) es la leguminosa más importante en la nutrición humana, siendo fuente fundamental de diversas proteínas y de aminoácidos esenciales. Esta leguminosa participa en la alimentación de más de 500 millones de personas en América Latina, y del este y sur de Africa. Se calcula que para cerca de 100 millones de consumidores pobres, con una dieta basada en el almidón, representa el único aporte de proteínas.

El objetivo del presente trabajo, es movilizar plásmidos simbióticos de cepas de *Rhizobium* que nodulan plantas de *Phaseolus vulgaris* , a los diferentes fondos genéticos de las cepas utilizadas, analizando las características simbióticas de las cepas híbridas obtenidas.

Inicialmente se realizó el marcaje genético de los plásmidos simbióticos de *R. tropici* CIAT899, *R. tropici* H12, *R. etli* CFN42 y *R. etli* Sc15 y su posterior curación. Los plásmidos simbióticos fueron movilizados a las correspondientes cepas curadas con el mismo o diferente fondo genético, construyéndose distintas cepas híbridas de rizobios. El éxito de las construcciones realizadas fue comprobado mediante el estudio del perfil de plásmidos y por estudios de hibridaciones con la sonda Tn5 de las cepas híbridas obtenidas.

Se analizaron las características simbióticas de las cepas híbridas construidas. Se estudió la cinética de nodulación, la competitividad, el rango de hospedador y la fijación de nitrógeno. Asimismo se analizaron los LPS producidos por dichas cepas. Los resultados obtenidos no mostraron variaciones en el perfil de LPS de las cepas híbridas analizadas, aunque sí en las características simbióticas, afectándose únicamente la competitividad por la movilidad de los plásmidos simbióticos.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto Europeo INCO-DEV (Nº ERBIC18CT 980321) y el Proyecto del MCyT nº PB1116.

SIII-7

Estudio de los sistemas PGPRs/rizobios que interaccionan con leguminosas.

Estévez, J.*, Dardanelli, M.S.[1], García-Trigueros, C.[1], Ollero, F.J.[2], Sousa, C.[1], y Megías, M.[1].

[1]Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia. Sevilla.
[2]Departamento de Microbiología, Facultad de Biología. Sevilla.
**janufi@arrakis.es*

Numerosas especies bacterianas que se encuentran en la rizosfera estimulan el crecimiento de la planta mediante una gran variedad de mecanismos. Estas bacterias son conocidas como PGPR (plant growth promoting rhizobacteria). Los mecanismos promotores del crecimiento que emplean pueden clasificarse en directos, consistentes en un aumento del aporte de nutrientes de la planta, e indirectos, influyendo positivamente sobre la morfología vegetal y/u otras relaciones simbióticas.

Dentro del primer grupo encontramos ejemplos de mecanismos como la solubilización del fosfato de la rizosfera, gracias a la acción de fosfatasas y ácidos orgánicos sintetizados por la PGPR, que facilitan la conversión del fosfato en formas accesibles para la planta. También facilitan la absorción de hierro mediante la producción de sideróforos, favoreciendo directamente el crecimiento de la planta, pero constituyendo al mismo tiempo un biocontrol de forma indirecta sobre fitopatógenos, puesto que compiten contra ellos por el nicho ecológico y dificultan su captación de nutrientes.

Algunas PGPRs pueden indirectamente favorecer también el crecimiento de la planta vía sinergismo o promoción de los efectos beneficiosos de una simbiosis tripartita que puedan establecer con un tercer grupo de microorganismos: los rizobios. Es por ello por lo que se les califica de "bacterias ayudantes" ("helper bacteria") .Este efecto beneficioso es el resultado de una primera acción por parte de la PGPR sobre la planta, leguminosa en este caso, promoviendo tanto su crecimiento como un aumento de su producción de flavonoides, lo cual generará finalmente un incremento de la tasa de nodulación del rizobio. Pero también puede que dicha tasa se vea alterada por una influencia directa de la PGPR sobre el rizobio. Con el fin de cualificar y cuantificar dicha influencia se llevaron a cabo los siguientes ensayos:

1. Estudio del crecimiento de los rizobios integrantes de la simbiosis tripartita.
2. Expresión de los genes de nodulación mediante la utilización del gen informador *lacZ*.
3. Análisis de la biosíntesis de los factores de nodulación producidos por la bacteria mediante cromatografía de capa fina.

Todo ello se realizó bajo condiciones control de crecimiento y condiciones influenciadas en distintas proporciones por la presencia de la PGPR. Cuatro fueron los rizobios elegidos para el estudio (dos nodulantes de judía, *Rhizobium tropici* CIAT899 y *Rhizobium etli* ISP42; y dos de soja, *Sinorhizobium fredii* SMH12 y *S. fredii* HH103) y tres PGPR (*Pseudomonas fluorescens* WSC17, *Azospirillum brasilense* Sp7, *Chryseobacterium balustinum).*

SIII-8

Influencia del estrés salino sobre la expresión de los genes de nodulación y biosíntesis de las moléculas señal de *R. tropici* CIAT899.

Estévez, J.[1], Dardanelli, M.S.[1], Morón, B.[1], Fernández, F., Soria-Díaz, M.E.[2], Thomas-Oates, J., Gil-Serrano, A.[2], Sousa, C.[1], y Megías, M.[1]*.

[1]Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia. Sevilla.
[2]Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química. Sevilla.
**megiasg@us.es*

La familia de las fabáceas o leguminosas establece una conocida relación simbiótica con el grupo de bacterias conocidas como "rizobios", durante la cual las bacterias inducen la creación de unos órganos en los pelos radicales de la leguminosa (nódulos), en los que se produce la fijación de nitrógeno. De esta forma la planta incorpora el nitrógeno necesario para realizar sus funciones metabólicas, a cambio de hidratos de carbono que aporta al rizobio.

Para que el proceso de nodulación se lleve a cabo es necesario un intercambio previo de moléculas entre la planta y el rizobio. La planta secreta un exudado cuyos componentes (flavonoides en su mayoría) inducen la expresión de unos genes bacterianos conocidos como "genes de nodulación" (*nod*, *nol* y *noe*). La expresión de los genes *nod* dá lugar a la síntesis y excreción de una molécula lipoquitooligosacarídica, denominada molécula señal o factor Nod, que actúa sobre el hospedador induciendo la organogénesis del nódulo. Todos los factores Nod descritos hasta la fecha constan de un esqueleto común de 3-5 unidades de N-acetilglucosamina, sobre el que se disponen varios sustituyentes, variables en función de la especie bacteriana, y que confieren la especificidad de hospedador inherente al proceso de nodulación.

El establecimiento de esta simbiosis se ve afectada negativamente por la salinidad del suelo y factores asociados a ella, disminuyendo considerablemente la tasa de crecimiento bacteriano, la eficacia de nodulación y/o la fijación de nitrógeno. Con el fin de determinar en qué modo el estrés salino provoca una modificación en la señal liberada por la bacteria se estudiaron los siguientes aspectos:

1) Influencia del estrés salino sobre el crecimiento de *R. tropici* CIAT899 (curvas de crecimiento).
2) Expresión de los genes de nodulación mediante la técnica de β-galactosidasa.
3) Factores de nodulación sintetizados por la cepa bajo distintas condiciones salinas mediante cromatografía de capa fina.
4) Estructura de la molécula señal por HPLC y espectrometría.

Para ello escogimos la cepa *Rhizobium tropici* CIAT899, simbionte de amplio rango de hospedador capaz de nodular numerosas leguminosas: *Phaseolus vulgaris* (judía, muy usada para la elaboración de piensos en el mundo animal e importante fuente de proteínas en la dieta humana), *Leucaena leucocephala* (leucena) y *Macroptilium atropurpureum* (siratro). Estos estudios mostraron que, bajo condiciones salinas, se induce una mayor expresión de los genes de nodulación, sintetizándose incluso nuevos factores de nodulación que no se observan cuando la bacteria crece en ausencia de sal.

SIII-9

Estudio de la respuesta del sistema PGPR/Rizobia frente a exudados de judía.

Dardanelli, M.[1]*, Estévez, J.[1], López Baena, F.[2], Ojeda, J.[1], Sousa, C.[1], y Megías, M.[1]

[1]Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, [2]Departamento de Microbiología, Facultad de Biología. Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla.
**msd@us.es*

Las plantas exudan una variedad de iones inorgánicos (protones, fosfatos, otros nutrientes, etc.) y de compuestos orgánicos (aniones carboxilados, fenólicos, carbohidratos, aminoácidos, proteínas y enzimas, etc.) en el suelo que cambian la química y la biología de la rizosfera y permite su adaptación en un ambiente en particular. El conocimiento del papel que los exudados juegan en la adaptación de las plantas, puntualmente de las leguminosas, y en la dinámica del diálogo molecular con los microorganismos del suelo constituyen la base científica del empleo de microorganismos beneficiosos para el desarrollo de las plantas y , por lo tanto, para el empleo de inoculantes.

Pero no solo los exudados radiculares condicionan este diálogo molecular, ya que los factores ambientales extremos afectan tanto a la planta como a los microorganismos y a los procesos de interacción que pudieran llevarse a cabo entre ellos. Un ejemplo claro es la tolerancia a la sal que produce cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y genéticos en leguminosas y microorganismos.

Las bacterias cuyo efecto es claramente promotor del crecimiento se denominan Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR), término que incluye aquellas bacterias que inducen el crecimiento de la planta, mejorando la nutrición y/o alterando su balance hormonal y aquellas que previenen o evitan el efecto de microorganismos patógenos. Las PGPRs se seleccionan como resultado de los procesos de coadaptación y coevolución entre la planta y los microorganismos que se desarrollan bajo la influencia de las raíces.

El colectivo de bacterias del suelo denominadas rizobios está constituido por simbiontes procarióticos que inducen la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas. La formación de este nuevo órgano en la planta requiere de una amplia comunicación molecular entre la planta y la bacteria, tales como los flavonoides exudados por las raíces de las leguminosas, los factores de nodulación sintetizados por los rizobios en respuesta a la percepción de los flavonoides y distintos componentes de la superficie bacteriana.

En función de estos antecedentes nos hemos propuesto los siguientes objetivos de trabajo:

1.- Obtención de exudados de judía en condiciones control y en presencia de 50 mM de NaCl (concentración que permite el crecimiento de la planta)

2.- Conocer el efecto de estos exudados sobre el crecimiento de rizobios y PGPRs/ISR

3.- Estudiar la influencia de los exudados producidos por judía sobre la expresión de genes de nodulación y biosíntesis de factores de nodulación producidos por rizobios en ausencia y presencia de estrés salino.

SIII-10

Efectos de la interacción molecular entre PGPRs/ISR-rizobios: sideróforos, homoserina lactonas, proteínas de secreción, LPSs y otros componentes superficiales.

Espuny, M.R.[1]*, Bellogín, R.A.[1], Cubo, T.[1], Dardanelli, M.S.[2], López-Baena, F.J.[1], Megias, M.[2], y Ollero, F.J.[1]

[1]Departamento de Microbiología, Facultad de Biología,Universidad de Sevilla. Apdo. 1095
[2]Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla, Apdo. 874.
**espuny@us.es*

Las bacterias que colonizan activamente la rizosfera de las plantas y benefician con su actividad el desarrollo de éstas son denominadas rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPRs). Los efectos beneficiosos pueden venir determinados por la producción de factores que directamente mejoran la nutrición vegetal (rizobacterias biofertilizadoras) o por su actividad de control biológico sobre los fitopatógenos (rizobacterias biopesticidas). En la actualidad se sabe que algunas PGPRs con actividad de control biológico lo son porque activan los sistemas de defensa de la planta, provocando una resistencia inducida que está mediada por ácido jasmónico y etileno y que se extiende lejos de los lugares de infección. A la resistencia sistémica desencadenada por las PGPRs se le denomina "resistencia sistémica inducida" (ISR) y es dependiente de la colonización del sistema radical por un número suficiente de PGPRs. La ISR es fenotípicamente similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR) desencadenada por patógenos. Entre los componentes de las rizobacterias que disparan la ISR se encuentran los LPSs, especialmente el antígeno O, los sideróforos y el ácido salicílico (SA).

Como es conocido, entre los componentes de los rizobios que afectan a la efectividad de la simbiosis con las leguminosas se encuentran, además de los factores de nodulación, los polisacáridos superficiales (LPSs, β-glucanos, KPSs, EPSs), y las proteínas que secretan algunas estirpes de rizobios a través del sistema de secreción de tipo III (TTSS). Algunos de estos componentes parecen estar implicados en el desencadenamiento/bloqueo de la respuesta de defensa de la planta heteróloga/homóloga,

Por otra parte, muchos de los genes que se expresan durante el establecimiento de cualquier relación planta-microorganismo se encuentran regulados por el fenómeno de percepción de quórum (quorum sensing).

Por todo ello hemos analizado la repercusión de la mutua interacción molecular entre las estirpes PGPRs *Azospirillum brasilense* Sp7, *Chryseobacterium balustinum* LUP4 *y Pseudomonas fluorescens* WCS416r y los rizobios *Sinorhizobium fredii* SMH12 y HH103, *Rhizobium etli* ISP42 y *Rhizobium tropici* CIAT899. En particular, hemos analizado la producción de homoserina lactonas y de sideróforos, los perfiles electroforéticos de los LPSs y las características de mucosidad, acumulación de Rojo Congo y fluorescencia en medio con calcofúor de cada una de las estirpes anteriores cultivadas sobre los líquidos metabólicos libres de células de las otras, comparando con esos mismos factores producidos cuando se cultivan en un medio mineral.

Trabajos subvencionados por el proyecto del MCyT nº AGL2002-04188-C06-04.

SIII-11

Estudios preliminares de colonización de raíces de *Phaseolus vulgaris* por diferentes microorganismos (Rizobios y PGPR's).

Rodríguez-Navarro, D. N.[1]*, López Baena, F. J.[2], Dardanelli, M. S.[3], Albareda Contreras, M.[1], y Megías, M.[3]

[1]CIFA-Las Torres y Tomejil, (IFAPA), 41200-Alcalá del Río (Sevilla) [2] Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, [3] Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla.
**dulcenombre.rodriguez@juntadeandalucia.es*

Se define la rizosfera como la porción de suelo que conforma un hábitat muy complejo donde se desarrollan las raíces de las plantas y cuya composición se ve alterada por la actividad de las mismas (Hiltner, 1904). Un componente crucial de la rizosfera lo componen diversas poblaciones microbianas cuya actividad es dependiente de los nutrientes proporcionados por los exudados radicales; en respuesta, las poblaciones microbianas rizosféricas afectan tanto al desarrollo y arquitectura de las raíces como al estado nutricional, desarrollo y sanidad de la planta.

La colonización de las raíces de las plantas es el primer paso de una secuencia de etapas que conduce a la supervivencia y establecimiento de microorganismos, que bien inoculados sobre las semillas o en el suelo, proliferan en respuesta a los exudados de las semilas y/o raíces. Los microorganismos que colonizan la rizosfera pueden clasificarse de acuerdo con los efectos que provoquen en las plantas y la *forma* de interactuar con las raíces. Además de los microorganismos patógenos, una gran mayoría inducen efectos beneficiosos, entre los más importantes se encuentran estirpes de la Familia Rhizobiaceae, hongos micorrícicos y las denominadas de forma genérica PGPR´s o Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria.

Se ha puesto a punto una técnica para estudiar la colonización de raíces de *Phaseolus vulgaris* por diversos microorganismos rizosféricos de interés agronómico (*Rhizobium tropici*, *Sinorhizobium fredii*, *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas fluorescens* y *Chryseobacterium balustinum*). Se han estudiado las siguientes variables: i) colonización en condiciones control (sin ClNa) tanto para el cultivo de la planta como de los microorganismos, así como en presencia de 50 mM de ClNa. ii) cinética de la colonización a diferentes tiempos de incubación. iii) efecto del tamaño de inóculo sobre la tasa de adhesión (número de bacterias adheridas cm^{-1} de raíz). A la vista de los resultados se estableció un período de incubación de 60 min. como el más apropiado para cuantificar la adhesión; la presencia de sal tuvo un efecto variable sobre la adhesividad de cada microorganismo; y la tasa de adhesión varió entre 10^2 (*R. tropici* y *Chryseobacterium*) -10^4 (*Pseudomonas* y *Azospirillum*) bacterias/cm de raíz.

Estos estudios preliminares de colonización, empleando estirpes marcadas con gfp (pMP2463) [(1)], y cuantificación en medios selectivos nos permitirán posteriormente visualizar los eventos de adhesión y colonización mediante microscopía de fluorescencia y/o confocal.

Financiación Proyecto: AGL2002-04188-CO6

[1]Stuurman, N. et al. MPMI 13(11): 1163-1169 (2000).

SIII-12

Caracterización de *Pseudomonas fluorescens* con propiedades PGP aisladas de la rizosfera de *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste).

Donate Correa, J., Pérez Galdona, R.*, y León Barrios, M.

Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38071 La Laguna. Tenerife.
**rperezga@ull.es*

Las bacterias Gram negativas constituyen la población más abundante de la rizosfera de tagasaste, siendo las de la especie *Pseudomonas fluorescens* uno de los grupos predominantes [(1)]. Por ello, y porque como es bien conocido esta especie presenta importantes propiedades relacionadas con la promoción del crecimiento vegetal (PGP), fueron caracterizadas para estas propiedades.

Las propiedades ensayadas fueron: producción de ácido indol acético (AIA), producción de cianhídrico (HCN), inhibición del crecimiento fúngico, solubilización de fosfato, fijación de nitrógeno y ACC desaminasa.

De las seis cepas estudiadas, todas presentaron más de una propiedad PGP, siendo la producción de AIA común para todas las ellas. Fue frecuente (4 cepas) la capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporium* y *Fusarium proliferatum* y la posesión de actividad ACC desaminasa. Menos frecuente fue la de fijar nitrógeno (2 cepas) y de producir HCN (3 cepas). Ninguna fue capaz de solubilizar fosfato, un resultado sorprendente dado que esta propiedad ha sido descrita como muy frecuente en este grupo de bacterias.

Los resultados presentados indican que cepas de *P. fluorescens* con propiedades PGP son aisladas con frecuencia de la rizosfera de tagasaste, las cuales podrían por ello ser usadas como coinoculantes para mejorar el crecimiento de esta leguminosa, bien por estimulación directa o indirecta.

[1] Donate Correa, J. M. León Barrios & R. Pérez Galdona. Plant and Soil (en prensa).

SIII-13

Efecto de *Pseudomonas fluorescens* ACCd$^+$ sobre *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste).

Donate Correa, J., Pérez Galdona, R., y León Barrios, M.*

Departamento de Microbiología y Biología Celular. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38071 La Laguna. Tenerife
**mileonba@ull.es*

La ACC desaminasa es una enzima capaz de degradar el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), el precursor de la fitohormona etileno. Por ello, es de interés el aislamiento de bacterias rizosféricas que presenten esta actividad, ya que suelen ejercer un efecto positivo sobre el desarrollo de la planta [(1)].

Once cepas de *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera de la leguminosa *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste) fueron ensayadas para la presencia de actividad ACC desaminasa, detectándose actividad en siete de ellas, lo que parece indicar que esta actividad está muy extendida entre las cepas de *Pseudomonas* que colonizan el tagasaste. Las cuatro que presentaron actividades significativas de esta enzima, por encima de 100 $nm.mg^{-1}.h^{-1}$ (Tabla), pertenecieron a la especie *P. fluorescens*. Cuando se ensayaron estas cepas sobre raíces germinadas de tagasaste, todas inhibieron la síntesis de etileno en mayor medida que un control negativo sin bacteria, aunque menos que un control positivo de un inhibidor químico, y mostraron un ligero efecto sobre la elongación de las raíces de esta leguminosa. En experimentos de coinoculación con un rizobio de plántulas de tagasaste, tres de las cepas parecen tener un efecto positivo sobre el aumento del número de nódulos. Así, aunque no se pueden descartar la implicación de otros factores, la coinoculación de leguminosas con cepas de *P. fluorescens* con actividad ACCd puede favorecer la nodulación.

Actividades ACC deaminasa detectadas en cepas de *Pseudomonas* aisladas de la rizosfera de tagasaste

Cepas	α-Cetobutirato[a] ($nm\ mg^{-1}\ h^{-1}$)
P. fluorescens LL1	195.10 ± 23.1
P. fluorescens LL2	112.36 ± 16.3
P. fluorescens LL3	22.40 ± 3.6
P. fluorescens LL4	11.13 ± 4.2
P. fluorescens LL5	170.21 ± 19.4
P. fluorescens ET1	164.24 ± 26.8
P. putida LL1	26.33 ± 5.9

[a]Media aritmética ± desviación estándar de cinco experimentos.

[1]Penrose, D.M., B.A. Moffat & B.R. Glick. Can. J. Microbiol. 47: 77-80 (2001)

SIII-14

Evaluación de las poblaciones indígenas de rizobios que nodulan con la soja en suelos de China.

Buendía-Clavería, A.[1]*, Bonilla Mangas, I.[2], Gutiérrez, R.[1], Hidalgo, A.[1], Lucena Marotta, J. J.[3], Parada, M.[1], Rodríguez Navarro, D. N.[4], Temprano, F.[4], Vinardell, J.M.[1], Yang, S. S.[5], y Zhou, J.C.[6].

[1]Departamento de Microbiología Facultad de Biología, Universidad de Sevilla. Apdo 1095. 41080-Sevilla. España.
[2]Departamento de Biología, [3]Departamento de Química Agrícola. Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco M-28049. Madrid. España.
[4]Departamento de Suelos y Riego, CIFA las Torres y Tomejil, Apartado de Correos Oficial, 41200-Alcalá del Río, Sevilla, España.
[5]Department of Microbiology, China Agricultural University, 2 Yuan Ming Yuan West Road, 100094 Beijing, People's Republic of China.
[6]Department of Microbiology, Huazhong Agricultural University, Shi Zi Shan Street, PO Box 430070, Wuhan, People's Republic of China.
**buendi@us.es*

En el marco de las investigaciones realizadas en un proyecto del programa INCO-DEV de la Unión Europea (ICA4-CT-2001-10056) hemos estimado el tamaño de las poblaciones naturales de rizobios que nodulan con la soja (muy probablemente estirpes de *Sinorhizobium fredii* o de *Bradyrhizobium japonicum*). Se han analizado tres muestras diferentes de suelos de 11 provincias chinas, en un eje norte-sur que va desde la frontera con Rusia al golfo de Tonkin. Las muestras de suelo analizadas pertenecen a las siguientes provincias: Heilongjiang, Liaoning, Jilin, Neimenggu, Hebei, Shanxi, Jiangsu, Anhui, Chongqin Guizhou y Guangxi. Mediante la técnica del número más probable (MPN) se han estimado las poblaciones naturales que nodulan con dos variedades diferentes de soja: una variedad americana (Osumi) y una variedad asiática que varió según la localidad de donde se había extraído la muestra de suelo.

La mayoría de las muestras analizadas contienen rizobios que nodulan con la soja. El hecho de que ciertas muestras de suelo provengan de zonas en las que nunca se ha cultivado soja no es determinante para que haya, o no, poblaciones naturales que nodulen con esta leguminosa. Así, en el condado de Yongchuan (de la región de Chongqin) no se ha cultivado soja y, sin embargo, se detectan poblaciones indígenas de rizobios de la soja (entre 420-5100 rizobios/gramo de suelo). Los suelos ácidos, como en Zhongxian (Chongqin, pH 4,72), tienen rizobios (*S. fredii* y *B. japonicum*) que nodulan con la soja (entre 10.000 y 100.000 rizobios/gramo de suelo). Se ha analizado el contenido de elementos de las muestras de suelo mediante ICP (inducción de plasma) y por colorimetría, con adiciones conocidas para evitar interferencias. Los resultados indican que algunas zonas contienen concentraciones anormalmente altas de ciertos elementos, como Cd, Pb, Ce y Nd. Mientras que los dos primeros representan toxicidad para las plantas, los otros dos resultan sorprendentes y, de momento, no sabemos a qué se debe su presencia en tan altas concentraciones.

Estos trabajos han sido financiados por el proyecto INCO-DEV ICA4-CT2001-10056

SIII-15

Diseño de un sistema de doble raíz no destructivo para los estudios de nodulación de *Sinorhizobium fredii* con la soja.

Hidalgo, A.*, Buendía-Clavería, A., Gutiérrez, R., Parada, M., Vinardell, J.M., y Ruiz-Sainz, J.E.

Dpto Microbiología, Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Apdo 1095. 41080-Sevilla.
**jvinar@us.es*

Con el nombre de sistemas de doble raíz (SDR) se designan aquéllos en los que la planta tiene sustituida su raíz principal por dos raíces (o fascículos) laterales. Básicamente, el sistema consiste en cortar la raíz principal de semillas germinadas (2 días), dejar que se desarrollen raíces laterales (5 días) y distribuir éstas en dos grupos homogéneos separados en dos tubos diferentes (raíces "A" y "B"). Este sistema sirve para realizar tratamientos distintos sobre una misma planta.

Hasta ahora, los SDR conllevaban la destrucción de la planta en el momento de analizar los distintos parámetros. Nuestro sistema permite la recogida de datos sin tener que destruir la planta, ya que se puede observar en todo momento la aparición de los nódulos sin necesidad de desmontar el sistema.

Con objeto de comprobar que el sistema diseñado por nosotros responde de forma similar a los SDR antes empleados (destructivos) se han realizado una serie de comprobaciones:

a) Cinética de nodulación.
   Se realizan dos tipos de experimentos, uno en el que sólo se inocula una de las dos raíces, y otro en el que se inoculan las dos simultáneamente. Los resultados indican que cada una de las raíces (A o B) actúan como si fueran raíces independientes.
b) Variaciones del pH de la solución nutritiva para plantas.
   Hemos comprobado que el pH desciende hasta valores similares independientemente de si se inocula una sola raíz o si se inoculan las dos raíces.
c) Estudios de autorregulación.
   Hemos querido estudiar el momento en que la respuesta de autorregulación de la planta inhibe la formación de nuevos nódulos. Para ello, se ha inoculado la raíz "A" y a distintos tiempos (0, 6, 9 y 12 días) se inoculan las raíces "B". Los resultados indican que cuando la inoculación de la raíz B se retrasa 6 días respecto de la raíz A, el número de nódulos que se forma en la raíz B es significativamente menor que el formado en la raíz A.

Estos trabajos han sido financiados por el proyecto INCO-DEV ICA4-CT2001-10056

SIII-16

Estudios de competitividad y de bloqueo en la simbiosis *Sinorhizobium fredii*-soja usando un sistema de doble raíz.

Vinardell, J.M*., Buendía-Clavería, A., Gutierrez, R., Hidalgo, A., Parada, M., y Ruiz-Sainz, J.E.

Dpto Microbiología, Facultad de Biología. Universidad de Sevilla. Apdo 1095. 41080-Sevilla.
**jvinar@us.es*

Hemos desarrollado un sistema de doble raíz (SDR) no destructivo para la soja (ver comunicación SIII-15 Hidalgo, A. y col.: " Diseño de un sistema de doble raíz no destructivo para los estudios de nodulación de *S. fredii* con la soja"). El empleo de este sistema nos ha permitido abordar dos aspectos de la nodulación de la soja con estirpes de *Sinorhizobium fredii* y/o *Bradyrhizobium japonicum*.

a) Estudios de competitividad.
En estudios previos realizados en nuestro laboratorio se había determinado que la estirpe USDA110 de *B.japonicum* es más competitiva que la estirpe HH103 de *S. fredii*. Hemos usado el SDR para ver si al separar espacialmente los inoculantes (uno en la raíz A y el otro en la raíz B) se reproducían las mismas relaciones de dominancia entre ellos. Con este objeto se realizan dos tratamientos: en el primero se inocula la raíz A con HH103 y la raíz B con USDA110, y en el segundo, se inoculan ambas raíces con los dos inoculantes.

Los resultados demuestran que no se dan esas relaciones cuando los inoculantes se encuentran separados físicamente (primer tratamiento), pero sí se da una mayor dominancia de USDA110 sobre HH103 cuando los inoculantes están juntos en la misma raíz, es decir, cuando compiten por los mismos puntos de infección.

b) Estudios de bloqueo de la nodulación.
Algunas estirpes de *S. fredii* (como USDA 257) forman simbiosis efectivas con las variedades asiáticas de soja, pero no forman nódulos fijadores con las variedades americanas de soja. Por otro lado, existe un mutante de USDA257 (llamado 257-DH4), que por tener una inserción del trasposón Tn5 en el plásmido simbiótico (gen *nol*U), es capaz de formar nódulos fijadores en las sojas americanas. Sin embargo, este mutante es bloqueado por su estirpe parental silvestre para nodular en las sojas americanas cuando ambos inoculantes se aplican conjuntamente sobre la misma raíz.

Usando el sistema SDR hemos investigado si la capacidad bloqueante de USDA 257 se manifiesta cuando ésta y su mutante DH4 se encuentran en raíces separadas (A y B). Los tratamientos realizados fueron los siguientes: inoculación de ambas raíces con ambas estirpes (USDA257 y DH4) e inoculación de la raíz A con USDA 257 y de la raíz B con DH4. Los resultados obtenidos indican que sólo existe "bloqueo" en el primer caso. Por consiguiente, las relaciones de "competitividad y bloqueo" sólo se manifiestan cuando las estirpes inoculantes están compitiendo por los mismos puntos de infección de la raíz.

Estos trabajos han sido financiados por el proyecto INCO-DEV ICA4-CT2001-10056

SIII-17

Identificación de genes de *Sinorhizobium fredii* implicados en la biosíntesis de KPS y estudio de su papel en la simbiosis con diversas leguminosas.

Parada, M.[1, 2*], Vinardell, J.M.[1], Ollero, F.J.[1], Lei, W.[1, 3], Hidalgo, A.[1], Buendía-Clavería, A.M.[1], Gutiérrez, R.[1], y Ruiz Sainz, J.E.[1]

[1]Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, 41012-Sevilla, España.
[2] Universidad de La Frontera, Temuco, Chile.
[3] China Agricultural University, Beijing, China.
**mparada@ufro.cl; jvinar@us.es*

Sinorhizobium fredii induce la formación de nódulos determinados en soja (*Glycine max*) y nódulos indeterminados en *Sophora tomentosa* (árbol leguminosa). El fenotipo simbiótico de mutantes de *Rhizobium* afectados en los polisacáridos superficiales depende del tipo de nódulo, determinado o indeterminado, que forme la leguminosa hospedadora.

El objetivo de este trabajo es el estudio del papel simbiótico del exopolisacárido (EPS) y del polisacárido capsular tipo antígeno K (KPS) producidos por *S. fredii* HH103. Para ello, se han obtenido mutantes de *S. fredii* afectados en los genes *rkp* (responsables de la biosíntesis y transporte de KPS) y en el gen *exoA* (implicado en la biosíntesis de EPS).

Un mutante *rkpH* de *S. fredii* HH103, denominado SVQ528, induce en soja sólo entre un 10 y un 25% de los nódulos inducidos por la estirpe parental HH103. En cambio, estudios preliminares no revelan diferencias apreciables en el comportamiento simbiótico de HH103 y SVQ528 en *Sophora tomentosa*. Por otra parte, la mutación en el gen *exoA* (estirpe SVQ530), que suprime la producción de EPS, no afecta a la interacción con soja pero reduce drásticamente la nodulación en *Sophora tomentosa*.

Así, en *S. fredii* HH103 el KPS parece jugar un papel importante en la interacción de la bacteria con leguminosas que forman nódulos de tipo determinado, como la soja, en tanto que el EPS parece ser más importante en la simbiosis con leguminosas que desarrollan nódulos de tipo indeterminado, como *Sophora tomentosa*. Estos resultados difieren de los obtenidos en *S. meliloti*, donde se requiere la presencia de al menos de uno de estos dos polisacáridos (EPS y/o KPS) para una interacción efectiva con su planta hospedadora, *Medicago sativa* (planta que forma nódulos indeterminados).

En la actualidad se está estudiando en ambas plantas hospedadoras el comportamiento simbiótico de otros mutantes afectados en genes *rkp* (*rkpD, rkpG y rkpI*) y de un doble mutante afectado en los genes *rkpH* y *exoA*.

Este trabajo está siendo financiado por el Proyecto BOS2002-04164-CO3-03 del Ministerio de Ciencia y Tecnología.

SIII-18

Genes regulados por *quorum sensing* y rizosfera en *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*.

Sánchez-Contreras, M.[1]*, Rodelas, B.[2], y Downie, A. J.[1]

[1]*Departamento de Microbiología Molecular, John Innes Centre. Norwich NR4 7UH, Reino Unido.*
[2]*Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, 18071 Granada.*
**maria.sanchez-contreras@bbsrc.ac.uk*

En la bacteria simbiótica *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, la expresión de numerosos genes está regulada por AHLs (N-acil homoserin lactonas) y es dependiente de la densidad celular. Este mecanismo de señalización es conocido como *quorum sensing* y permite el comportamiento coordinado de una población en diferentes estados de crecimiento.

Los genes *cinI* y *cinR* están arriba de la cascada de regulación en *R. leguminosarum*. CinI y CinR, que codifican respectivamente una sintasa de AHLs y un regulador transcripcional, controlan la expresión de otros genes de *quorum sensing* incluyendo *rhiI* y *rhiR*. Los genes *rhiI* y *rhiR* se encuentran en el plásmido simbiótico en esta estirpe y regulan la expresión del operón *rhiABC*, genes que se expresan en la rizosfera, y de un nuevo gen *rhiD*. Estos genes *rhi* se encuentran en *R. leguminosarum* biovar *viciae*, pero no están presentes en otros biovar.

La capacidad de nodulación y de fijación de nitrógeno de mutantes afectados en los genes *rhi* se ensayó usando diferentes cultivares de guisante. Algunos de los mutantes mostraron menores niveles de infección y una reducción de la fijación biológica de nitrógeno en determinados cultivares, y diferencias según el sustrato y las condiciones de competencia en la rizosfera.

SIII-19

Producción de moléculas señal en *Bradyrhizobium japonicum*.

Navascués Ortega, B.[1]*, Lorite, M.J.[1], Sánchez Raya, J.[1], Vílchez, R.[2], y Bedmar, E.J.[1]

[1]Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada, y [2]Grupo de Microbiología Ambiental, Instituto del Agua. Universidad de Granada, 18071 Granada.
**bea.navascues@eez.csic.es*

Se ha demostrado que las bacterias regulan la expresión de ciertos genes en respuesta a la densidad de sus poblaciones mediante sistemas de comunicación célula a célula. Este proceso se ha denominado quorum-sensing, o autoinducción, y se basa en la producción de moléculas señal, o autoinductores, difusibles y permeables a través de la membrana celular, que se acumulan en el medio. Cuando los mismos alcanzan un nivel determinado pasan de nuevo al interior celular donde activan la expresión de genes específicos. Ejemplos bien caracterizados de estas moléculas señal son las N-acil-homoserina lactonas, típicas de bacterias Gram-negativas, cuyo modelo de regulación implica un regulador transcripcional, proteína R, y una homoserina lactona sintasa (proteína I). Puesto que el proceso se describió por primera vez en *Photobacterium (Vibrio) fisheri* como sistema para controlar la bioluminiscencia, los genes implicados se denominaron *luxRI*.

En algunos casos, el proceso de intercambio de señales no sólo ocurre entre las células procariotas, sino también entre bacterias y algunas especies eucariotas, como ocurre en la asociación simbiótica que se establece entre algunas especies del orden Rhizobiales, los rizobios, y las plantas leguminosas. Las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Azorhizobium* tienen la habilidad de infectar las raices de plantas leguminosas originando la formación de un nuevo órgano, el nódulo, donde se lleva a cabo el proceso de fijación biológica de dinitrógeno (N_2) atmosférico. La infección de la planta requiere los productos de los genes de nodulación de la bacteria, que codifican una lipoquitina como señal de nodulación. Esta señal Nod, una vez reconocida por la planta, induce un proceso de organogénesis que resulta en la formación del nódulo.

Se ha demostrado que algunos rizobios producen moléculas señal de la familia de las homoserina lactonas y que, en algunos casos, como *R. etli*, la mutación en los genes responsables de tales autoinductores afecta el fenotipo simbiótico. En *B. japonicum* se ha descrito un compuesto denominado bradioxetina que induce la expresión del gen *nwsB*. El producto de *nwsB*, a su vez, activa a *nolA* y NolA induce *nodD2*. La proteína NodD2, finalmente, inhibe la expresión de los genes *nodYABC*. No se han identificado los genes que codifican la bradioxetina, por lo que se desconoce su efecto sobre la nodulación de soja.

En este trabajo se describe la producción y caracterización parcial de molécula(s) señal en *B. japonicum* y se se analiza el efecto de una cepa mutada en el gen *luxI* sobre la nodulación de plantas de soja. La actividad biológica de la(s) moléculas(s) señal depués de la extracción del sobrenadante bacteriano, separación de fracciónes por columna de sílica gel y HPLC, se determinó mediante el bioensayo que utiliza *Chromobacterium violaceum* CV026 como marcador.

Este trabajo se ha subvencionado con el proyecto PROFIT, FIT050000-2001-30.

SIII-20

Implicación del transportador de molibdeno ModABC de *Bradyrhizobium japonicum* en la fijación simbiótica de nitrógeno.

Talbi, C.*, Tresierra-Ayala, A., Molinero, N., Bedmar, E. J., y Delgado, M. J.

Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
**chouhra.talbi@eez.csic.es*

El molibdeno (Mo) es un elemento que, como cofactor, forma parte de enzimas fundamentales para muchos microorganismos. *Bradyrhizobium japonicum* es una bacteria del orden *Rhizobiales* capaz de establecer asociaciones simbióticas fijadoras de dinitrógeno atmosférico (N_2) con plantas de soja (*Glycine max*). En el proceso de fijación de nitrógeno participa la enzima nitrogenasa, que contiene Mo como cofactor. Habiendo identificado los genes *modABC* que codifican los componentes de un sistema tipo ABC implicados en el transporte de alta afinidad de Mo, se obtuvo la mutante 0512 de *B. japonicum* afectada en el gen *modA*. En este trabajo se ha estudiado el efecto de la mutación en el gen *modA* sobre la fijación de N_2 en la simbiosis *B. japonicum-G. max*.

Mientras que no se observaron diferencias en la capacidad infectiva de la cepa parental USDA110 y la cepa mutante 0512, la capacidad fijadora de nitrógeno de la mutante fue menor a la de la cepa parental tras su inoculación en plantas de soja cultivadas en presencia de concentraciones limitantes de Mo (≤ 0,4μM). Mayores concentraciones de Mo permitían a la mutante recuperar el fenotipo silvestre. En condiciones limitantes de Mo, la disminución de la capacidad fijadora de nitrógeno de la cepa 0512 fue considerablemente mayor al incrementar la concentración de sulfato en la solución nutritiva de las plantas. Este hecho sugiere la existencia en bacteroides de *B. japonicum* de, al menos, dos sistemas transportadores de Mo, uno de alta afinidad, codificado por los genes *modABC*, y otro, probablemente, un transportador de sulfato que permite la incorporación de Mo con menor eficiencia.

El análisis mediante 'western blot' de los niveles del componente proteíco dinitrogenasa de la enzima nitrogenasa reveló que la limitación de Mo en los bacteroides de la cepa mutante *modA* no afectó a la síntesis de dicha proteína. Igualmente, no se observaron diferencias de actividad β-galactosidasa en los bacteroides de la cepa 0512, conteniendo una fusión transcripcional *nifD-lacZ,* independientemente de la concentración de Mo y sulfato presente en el medio de crecimiento de las plantas. Estos resultados sugieren que, a diferencia de lo observado en otras molibdoenzimas, el Mo no regula la expresión de la nitrogenasa en bacteroides de *B. japonicum* pero si es necesario para la máxima actividad de la enzima.

Este trabajo se ha subvencionado con los Proyectos CICYT BMC2002-04126-C03-02, PROFIT, FIT050000-2001-32 y la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación CVI-275. A.B. Tresierra agradece a AECI la concesión de una beca Mutis.

SIII-21

Análisis de la secuencia del gen *celC2* de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843.

Mateos, P.[1]* , Zurdo-Piñeiro, J.L.[1], Jiménez-Zurdo, J.I. [2], Ramírez-Bahena, M.H.[1], Velázquez, E.[1] , Trujillo, M.[1], y Martínez-Molina, E.

[1]Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca.
[2]Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
** pfmg@usal.es*

El establecimiento de una rizoendosimbiosis mutualista eficiente, en aquellos casos en que la bacteria penetra en la raíz de la leguminosa hospedador a través del canal de infección originado en los pelos radicales, supone que la bacteria debe penetrar en el pelo radical de forma que se mantenga la integridad del mismo y no se aborte el proceso infectivo, por lo que esta etapa puede considerarse crítica para el proceso posterior de la relación simbiótica.

La cepa *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii ANU843 produce un isoenzima con actividad celulásica, C2, que es el responsable de la ruptura de la integridad de la pared del pelo radical específicamente en el extremo isotrópico, no cristalino de la punta del pelo radical (zona que utiliza *Rhizobium* para penetrar en la planta hospedadora) de *Trifolium repens*.

La localización, aislamiento, clonación y secuenciación del gen que codifica para este enzima, *celC2* (GeneBank AJ561043), muestra un ORF de 1044 pb que presenta una alta similitud con el gen *cel8A* de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii 1536 (GeneBank AY227046) y el gen *celC* de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii R200 (GeneBank AF121340) que está localizado en una región del cromosoma involucrada en la biosíntesis de celulosa bacteriana. Sin embargo, el producto de la traducción de este gen, 1,4-β-D-endoglucanasa, se engloba dentro de la Familia 8 de las glicosil hidrolasas.

En la comunicación se discutirá la posible implicación de este gen en el proceso de infección *Rhizobium leguminosarum*-trébol, así como su presencia en otros microorganismos fijadores simbióticos de nitrógeno.

SIII-22

Identificación y caracterización de genes inducidos tempranamente en la simbiosis *Mesorhizobium loti-Lotus japonicus*.

Matamoros, M.[1]*, Pitzschke, A.[2], y Parniske, M.[2]

[1]Estación Experimental Aula Dei, CSIC, Avda. Montañana 1005, Apdo.202, 50080 Zaragoza.
[2]Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, Reino Unido.

El establecimiento de una simbiosis fijadora de N_2 entre las bacterias conocidas colectivamente como rizobios y las leguminosas requiere un intercambio de señales altamente sofisticado entre ambos simbiontes. La planta produce compuestos fenólicos, esencialmente flavonoides, que son percibidos por la bacteria, que responde a su vez con la producción de lipo-quitín-oligosacáridos denominados factores nod. Los factores nod desencadenan diversas respuestas en la planta, con el resultado de la formación de un órgano especializado, el nódulo. Entre estas respuestas se encuentran la despolarización y repolarización de la membrana plasmática, oscilaciones en los niveles de Ca^{+2} intracelular y la deformación de los pelos radiculares. Asimismo, los factores nod inducen cambios en la expresión de genes, lo cual provoca modificaciones en el desarrollo de la planta que finalmente conducen a la formación del nódulo.

Mediante la técnica cDNA-AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") hemos identificado dos genes (*φ24* y *fit*3) que son inducidos rápidamente en *Lotus japonicus* tras la infección con *Mesorhizobium loti*. *φ24* consiste en una secuencia parcial de 825 nucleótidos y es inducido 6h tras la infección con *M. loti*. Los niveles de expresión se mantienen elevados 24h y 6d después de la inoculación y son máximos en nódulos maduros. *φ24* no presenta homología con otras secuencias de nucleótidos o proteínas depositadas en las bases de datos. *fit*3 codifica una proteína de 791 aa y un PM de 87 KDa. De forma similar a *φ24*, *fit*3 es inducido tras 6h de infección con *M. loti* y la expresión se mantiene elevada 24h después de la inoculación. Sin embargo, el nivel de expresión en nódulos es menor que en las primeras fases de la infección. La proteína. FIT3 contiene 3 dominios conservados en varias proteínas de plantas y microorganismos: DUF 566, dominio específico de plantas sin función conocida presente en varias proteínas hipotéticas de Arabidopsis y *Oryza sativa*; COG 3643 y FTCD, dominios presentes en varias proteínas con función formiiminotransferasa de diversas especies de microorganismos. Estas proteínas están implicadas en el metabolismo de aa., particularmente His. Asimismo, en mamíferos hay indicios de que podrían funcionar como mediadores en la interacción entre vesículas provenientes del aparato de Golgi y los microtúbulos.

SIII-23

Interacción *Rhizobium*-micorriza en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* en condiciones de salinidad.

Iribarne, C.*, Olivera, M.,Tejera, N., y Lluch, C.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada Campus de Fuentenueva s/n 18071 – Granada.
**clluch@ugr.es*

La asociación simbiótica entre raíz de plantas e hifas de hongos (micorriza) ha sido establecida como un mecanismo en la adquisición de fósforo y otros elementos de baja movilidad en el suelo, para la planta. En general la simbiosis micorrícica contribuye a incrementar la resistencia/tolerancia de las plantas a diferentes situaciones de estrés como el déficit hídrico, la salinidad y/o la presencia de metales pesados. Además estimula la actividad fotosintética de la planta, mejora el enraizamiento de esta y la estructura del suelo, favorece la diversidad de las comunidades de plantas y la sucesión vegetal, y ayudan a superar el ataque de patógenos.

Estos efectos pueden ser modificados cuando la planta micorrizada (leguminosas) establece una simbiosis tripártica con especies del género *Rhizobium*, pudiendo responder al estrés salino u otro tipo de estrés con estrategias alternativas en determinados procesos fisiológicos. Esta comprobación la hemos llevado a cabo mediante experimentos realizados con plantas de *Phaseolus vulgaris* cultivadas en medio salino (25 mmol maceta^{-1} NaCl) e inoculadas con *Rhizobium tropici* CIAT 889 y una mezcla de esporas, hifas, procedentes de *Glomus mosseae*. Se evaluó la respuesta del crecimiento de la planta, de la actividad fotosintética (fluorescencia máxima, fluorescencia variable, rendimiento fotosintético y contenido de pigmentos) y del proceso de senescencia mediante la valoración de mecanismos de defensa frente a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (actividades enzimáticas del metabolismo oxidativo: actividad superoxidodismutasa, catalasa y enzimas del ciclo ascorbato-glutation, así como el contenido de metabolitos, H_2O_2, glutation y ascorbato).

La simbiosis tripartita se ve favorecida en el incremento de la superficie foliar, por tanto en el crecimiento de la planta, aunque relación raíz/parte aérea es menor. La salinidad es mejor soportada por las plantas micorrizadas que los nódulos con *Rhizobium* pero el efecto potenciador es discutido. Parámetros de fijación de nitrógeno (peso seco de nódulos, actividad reductora de acetileno, etc) con la micorrización (frecuencia, intensidad, cantidad de arbúsculos, etc) son muy esclarecedores de la respuesta observada.

Se comprueba que la fluorescencia de la clorofila es un método útil en los procesos rizosféricos relacionados con las simbiosis mutualistas. Por otra parte la activación de los mecanismos enzimáticos que previenen o evitan el daño ocasionado por ROS, así como algunos metabolitos, es controvertida. Por último, podemos indicar que la interacción *Rhizobium*-micorriza en el crecimiento de *Phaseolus vulgaris* en condiciones de salinidad favorece que esta especie se adapte mejor a condiciones de estrés salino debido a la alta eficacia del proceso fotosintético y a la activación de algunas de las enzimas antioxidantes.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto BOS2002-04182-CO2-02 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, y por la Junta de Andalucía a través del Grupo de Investigación AGR139.

SIII-24

El tratamiento de raices y semillas con factores Nod induce un mayor numero de nodulos en plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con una poblacion limitante de *Sinorhizobium meliloti*.

Brelles Mariño, G.*

Laboratoire des Interactions Plantes-Microorganismes, INRA/CNRS, Chemin de Borde-Rouge B.P. 27, 31326 Castanet-Tolosan, France. Dirección actual: Biological Sciences Department, California State Polytechnic University, 3801 W Temple Avenue, Pomona, CA 91768, U.S.A.
**gbrelles@csupomona.edu*

Medicago truncatula es una leguminosa modelo que interactúa simbioticamente con *Sinorhizobim meliloti*, el simbionte de alfalfa. Este proceso implica un diálogo molecular entre la bacteria y la planta. Las raíces de las leguminosas exudan flavonoides que inducen la expresión de un conjuntos de genes de los rizobios, los genes nod, que son esenciales tanto para la nodulación como para la determinación del rango de planta hospedadora. A su vez, los genes nod controlan la síntesis de lipo-quito-oligosacáridos (LCOs), llamados factores Nod, que son moléculas señal entre la bacteria y la planta que median el reconocimiento y la organogénesis del nódulo.

El objetivo de este trabajo fue determinar si había un efecto en la nodulación de plantas inoculadas de *Medicago truncatula* cuyas raíces o semillas habían sido previamente tratadas con factores Nod. Se trataron raíces y semillas de *Medicago truncatula* con una prepración purificada de factores Nod. Posteriormente, se inocularon raíces creciendo hidroponicamente, con una población limitante de *Sinorhizobium meliloti*. Se demostró que concentraciones submicromolares de los factores Nod incrementaban el número de nódulos por planta en *Medicago truncatula*. Este incremento fue más evidente al tratar semillas que al tratar raíces. Las semillas de *Medicago truncatula* respondieron a concentraciones submicromolares de factores Nod sugiriendo la posible presencia de un sistema de percepción de LCOs de alta afinidad en semillas y posiblemente en embriones.

Sesión IV.

Fisiología de la fijación de nitrógeno y asimilación

SIV-P1

Enzimas y genes implicados en el metabolismo de los ureidos y las amidas en leguminosas.

Pineda, M.[1]* , Piedras, P.[1], y Aguilar, M.[2]

[1]Departamento de Biología Vegetal, Sección de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba.
[2]Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias. Universidad de Córdoba, 14071 Córdoba.
**bb1piprm@uco.es*

Las plantas leguminosas tienen la capacidad de fijar dinitrógeno atmosférico gracias al establecimiento de relaciones simbióticas con bacterias del suelo. El nitrógeno fijado y asimilado en los nódulos radicales se puede transportar hasta las partes aéreas como amidas (glutamina y asparragina) o ureidos (alantoína y alantoato), lo que permite distinguir entre plantas amídicas (guisante, garbanzo,...) y ureídicas (soja, judía,...). Sin embargo, la "lógica de la planta" para usar ureidos o amidas es objeto de continua especulación. Algunas hipótesis apuntan hacia la economía en el uso del C ó del N, pero no hay certeza sobre su sentido fisiológico.

La vía principal para la síntesis de asparragina en plantas es la catalizada por la asparragina sintetasa (AS) dependiente de glutamina. Las aproximaciones moleculares al estudio de la AS han permitido demostrar que existen pequeñas familias multigénicas en leguminosas [2, 4, 5]. Los ureidos, alantoína y ácido alantoico, se sintetizan en los nódulos radicales mediante oxidaciones enzimáticas de las purinas vía xantina deshidrogenasa, uricasa, 5-hidroxiisourato hidrolasa, y alantoinasa. En los tejidos sumidero, estos compuestos se degradan para liberar el nitrógeno. La alantoinasa cataliza la transformación de alantoína en alantoato. La degradación de alantoato hasta glioxilato, constituye la verdadera "caja negra" en el metabolismo del nitrógeno en plantas. Se postula que el alantoato es degradado hasta ureidoglicolato y éste hasta glioxilato por dos posibles vías que se diferenciarían únicamente en el producto nitrogenado liberado, urea o amonio.

El objetivo general de nuestro grupo de investigación es profundizar en el conocimiento a nivel enzimático y molecular de la síntesis y degradación de amidas y ureidos. Se han clonado dos ADNc que codifican sendas AS en judía [4, 5] así como el gen que codifica la uricasa de garbanzo [1]. También se ha purificado la urato oxidasa de diversas fuentes [6] así como varias actividades degradadoras de ureidos a partir de algas y leguminosas [3, 7]. En esta comunicación se realizará una revisión de los conocimientos sobre metabolismo de amidas y ureidos en leguminosas.

[1]Caballero JL, Redondo Nevado J, Cárdenas J, Pineda M (1997). Anal Biochem 244: 167-169.
[2]Lam HM, Coschigano KT, Oliveira IC, MeloOliveira R, Coruzzi GM (1996). Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 47: 569-593.
[3]Muñoz A, Piedras P, Aguilar M, Pineda M (2001). Plant Physiol 125: 828-834.
[4]Osuna D, Gálvez G, Pineda M, Aguilar M (1999). Biochem Biophys Acta 1445: 75-85.
[5]Osuna D, Gálvez-Valdivieso G, Piedras P, Pineda M, Aguilar M (2001). Planta 213: 402-410.
[6]Montalbini P, Redondo J, Caballero JL, Cardenas J, Pineda M (1997). Planta 202: 277-283.
[7]Piedras, P, Muñoz A, Aguilar M, Pineda M (2000). Arch Biochem 378: 340-348.

SIV-P2

Fisiología de la fijación de nitrógeno en leguminosas: ¿qué sabemos realmente?

Arrese-Igor, C.*, González, E.M., Moran, J.F., Gálvez, L., Marino, D., Ladrera, R., Denia, E.

Dpto. Ciencias del Medio Natural, ETSI Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, Campus de Arrosadía s/n E-31006 Pamplona.
**cesarai@unavarra.es*

Los estudios fisiológicos, bioquímicos y, más recientemente, moleculares han permitido un conocimiento relativamente preciso del proceso de fijación en organismos diazotróficos, así como de su regulación y de su respuesta a cambios en el entorno. En la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas se ha producido un impresionante avance en la última década en nuestro conocimiento de los procesos que regulan la formación y desarrollo de los nódulos. Sin embargo, nuestra comprensión de los procesos de regulación del funcionamiento de la simbiosis establecida es aún muy incompleta, probablemente debido a que los mismos están constituidos por mecanismos que interaccionan a distintos niveles.

Por una parte, la mayor parte del nitrógeno fijado en los nódulos por Rhizobium se utiliza para nutrir al macrosimbionte, lo que limita la importancia de los sistemas procarióticos de control del estado nitrogenado. Esto ha llevado a postular, en diferentes formatos, la hipótesis de que es el estado de la nutrición nitrogenada de la planta el que podría estar controlando la velocidad de fijación de nitrógeno. Aunque aparentemente atractiva, las evidencias experimentales, para apoyar este modelo resultan bastante inciertas. Por otra parte, los cambios en el entorno de la simbiosis no son percibidos directamente por el bacteroide, el simbionte fijador, sino que son percibidos por la planta, la cual parece determinar un descenso de sus flujos metabólicos, lo que, a su vez, determina la actividad fijadora del bacteroide. En los últimos años, dicha modulación se ha relacionado con cambios en el flujo de oxígeno en nódulos. Más recientemente, también se ha relacionado con la capacidad de regular el flujo de carbono en el mismo, de forma independiente a la disponibilidad de fotoasimilados. En esta presentación se ofrecerán datos adicionales que apoyan la importancia de las interacciones carbono/nitrógeno en el metabolismo nodular. También se hará mención de algunas evidencias que comienzan a aflorar sobre las posibles vías de transducción de señales que median entre la percepción de cambios en el entorno y respuestas fisiológicas.

Finalmente, debe de señalarse que las aproximaciones, cada vez más reduccionistas, donde la práctica omisión de determinaciones simultáneas y fiables de la propia FBN, no resulta una cuestión menor, pueden limitar de forma considerable la evaluación del impacto real de reacciones simples en la fijación en su conjunto. Las perspectivas para la compresión y, en su caso, mejora de la fijación en leguminosas, un proceso con amplias implicaciones agrícolas y medioambientales, pasan necesariamente por la integración de estudios biofísicos, moleculares, metabólicos y fisiológicos.

Financiado parcialmente por los proyectos AGL 2002-02730 (que incluye la aportación de fondos FEDER) y FOOD-CT-2004-506223.
D. Marino y R. Ladrera son beneficiarios de becas del Gobierno Vasco y MECD, respectivamente.

SIV-1

Efecto del estrés oxidativo sobre la actividad ICDH en nódulos de guisante.

Marino, D., Denia, E., Gálvez, L., González, E.M., y Arrese-Igor, C*.

Dpto. Ciencias del Medio Natural, ETSI Agrónomos, Universidad Pública de Navarra, Campus de Arrosadía s/n E-31006 Pamplona.
**cesarai@unavarra.es*

La $NADP^+$-isocitrato deshidrogenasa (ICDH) cataliza la descarboxilación oxidativa reversible de 2-oxoglutarato acoplada a la producción de un nucleótido de piridina [2]. Varias isoenzimas de ICDH están presentes en plantas, localizadas en diferentes compartimentos subcelulares: citosol, cloroplasto, peroxisoma y mitocondria [5]. En plantas superiores la actividad ICDH se localiza principalmente en el citosol (90%). Varios autores han propuesto la conexión entre el metabolismo del C y N como función clave de este enzima, proporcionando al citosol 2-oxoglutarato, para la asimilación primaria de N. La ICDH también posee un papel importante en el suministro de NADPH a la célula.

La actividad ICDH nodular se incrementó en plantas de *Pisum sativum* L. cv sugar-snap de cuatro semanas sometidas a un tratamiento de paraquat, herbicida generador de especies de oxígeno activado (EOA), mientras que otras actividades enzimáticas nodulares o bien no se ven afectadas o tienden a descender. Hemos encontrado cuatro isoformas de ICDH y detectado su actividad mediante electroforesis nativa en gel de poliacrilamida [1].

Este incremento de actividad podría ser producido como respuesta a una demanda de piridin nucleótidos reducidos por el sistema antioxidante ascorbato/glutatión dependiente de los niveles de NADPH citosólico [4]. Asimismo, podría ser resultado de una compensación a la limitación de carbono que ocurre en nódulos sometidos a estreses como la sequía [3].

Financiado por el proyecto AGL 2002-02730 y la aportación de la UE a través de fondos FEDER.
D. Marino y E. Denia son beneficiarios de becas del Gob. Vasco y Gob. de Navarra respectivamente.

[1]Canino S, Nieri B, Pistelli L, Alpi A, De Bellis L. 1996. Physiol. Plant 98: 13-19.
[2]Chen RD, LeMaréchal P, Vidal J, Jaquot JP, Gadal P. 1988. eur. J. Biochem. 175:565-572.
[3]González EM, Gálvez L, Royuela M, Aparicio-Tejo PM and Arrese-Igor C. 2001. Agronomie 21: 607-613
[4]Jo SH, Lee SH, Chun HS, Lee SM, Koh HJ, Lee SE, Chun JS, Park JW, Huh TL. 2002. Biochem. Biophys. Res. Commun. 292
[5]Lancien M, Ferrario-Méry S, Roux Y, Bismuth E, Masclaux C, Hirel B, Gadal P, Hodges M. 1999. Plant Physiol. 120:717-725.

SIV-2

Efecto de la disponibilidad de fosfato sobre la respuesta de *Phaseolus vulgaris* a la salinidad.

Olivera, M., Ocaña, A., Tejera, N., Herrera-Cervera, J.A., y Lluch, C.*

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n 18071 – Granada.
**clluch@ugr.es*

Las leguminosas fijadoras de nitrógeno tienen mayores requerimientos de fósforo que las no fijadoras. Por otra parte, la exposición a la salinidad afecta al transporte de iones en la planta, lo que provoca la alteración del estado nutricional y desequilibrio iónico en los tejidos. El efecto interactivo entre salinidad y el estado nutricional en la planta depende de la especie vegetal, de la concentración de sal, y del nivel de nutrientes. El estrés salino inhibe la absorción y el transporte de calcio, de nitrógeno y de fósforo [2]. Bernstein *et al.* (1995) [1] atribuyen la perdida de la tolerancia a la sal con altos niveles de fósforo, al efecto combinado del exceso de sal y a la toxicidad del fósforo, mientras que en los tratamientos deficientes de fósforo no se detecta esta pérdida de tolerancia.

Se estudia en este experimento el efecto del fósforo en la simbiosis *Phaseolus vulgaris-Rhizobium tropici* CIAT899 en condiciones de estrés salino, analizando el crecimiento, la fijación de nitrógeno, y el metabolismo nitrogenado y carbonado en nódulos, así como el contenido de ATP y la actividad fosfatasa ácida en diversos órganos. Las plantas se cultivaron en una cámara de condiciones ambientales controladas, con 0.05, 0.5, 1.5 y 2.0 mM de KH_2PO_4 en una solución nutritiva libre de nitrógeno, aplicándose dos concentraciones de sal (25 y 50 mM NaCl) a los 16 días de cultivo, cuando la simbiosis está bien establecida, realizándose la recogida de plantas a los 28 días, en floración.

El fósforo en el medio favoreció la actividad reductora de acetileno específica y total por planta, y el contenido de leghemoglobina, mientras que la sal provocó una inhibición de la fijación de nitrógeno en todas las dosis de fósforo, excepto con 2 mM.

La actividad PEPC de nódulos disminuyó con el fósforo en el medio de cultivo, en cambio con 25 mM del NaCl incrementó significativamente. La MDH fue estimulada por el fósforo y la salinidad en el medio. La xantina deshidrogenasa y la uricasa se estimularon con el fósforo, en cambio se inhibieron con la sal que interaccionó negativamente con el nivel de fósforo en el medio. El efecto de la sal en la actividad fosfatasa ácida fue drástico pues se redujo la actividad de la enzima en todos los tratamientos con sal. Los resultados obtenidos indican que el fósforo puede reducir o mitigar los efectos adversos de la salinidad en el crecimiento de la planta y en procesos fisiológicos claves de la simbiosis.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto BOS2002-04182-CO2-02 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, y por la Junta de Andalucía a través del Grupo de Investigación AGR139.

[1]Bernstein N., Silk W.K. y Läuchli A. 1995. Planta 196: 699-705.
[2]Martínez V. y Läuchli A. 1991. Physiol. Plant. 83: 627-632.

SIV-3

Actividad trehalasa y metabolismo carbonado en nódulos de *Medicago truncatula* bajo condiciones de estrés salino.

López, M.*, Herrera-Cervera, J.A., Iribarne, C., Ocaña, A., y Lluch, C.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada.
**mlgomez@ugr.es*

La trehalosa es un disacárido común en varios organismos incluyendo bacterias, hongos y algas donde desempeña un papel como almacenamiento de carbón reducido y además puede actuar como un importante protector frente a varios estreses, particularmente la desecación [1]. La trehalosa no está usualmente presente en plantas superiores, aunque se ha observado en tejidos de plantas colonizados por microorganismos, como en nódulos radicales de leguminosas, donde el microsimbionte tiene la capacidad para producir este disacárido [2]. La actividad trehalasa en nódulos de leguminosas tiene su origen en la planta, pudiendo considerarse a esta enzima como una nodulina con la función de hidrolizar la trehalosa originada por los bacteroides [3]. Sin embargo, no ha podido establecerse una correlación entre el contenido de trehalosa y la actividad trehalasa. En estudios anteriores se ha postulado el papel regulador de la trehalosa sobre el metabolismo carbonado del nódulo.

En este trabajo, se estudia la influencia del estrés causado por salinidad sobre el metabolismo carbonado nodular, y más concretamente, el papel de la trehalosa como molécula que interviene en el ajuste osmótico y en los mecanismos de adaptación al estrés salino. Para ello, se aplicaron tratamientos 0 mM, 25 mM y 50 mM de sal a plantas de *Medicago truncatula* inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* GR4, cultivadas durante 10 semanas en condiciones controladas de cultivo. Durante el tiempo de experimentación, se ha observado que las plantas control triplicaron su crecimiento de parte aérea respecto de las tratadas con 50 mM de sal, mientras que con 25 mM de sal, duplicaron su crecimiento [4]. En cambio, la relación raíz/parte aérea fue mayor en las plantas tratadas con sal. Por otro lado, se discutirá el comportamiento de las enzimas trehalasa, sacarosa sintasa, invertasa alcalina, malato deshidrogenasa, fosfoenol piruvato carboxilasa y fosfoenol piruvato carboxi kinasa del metabolismo carbonado en relación a la actividad trehalasa en las condiciones de estrés salino abordadas en el presente estudio.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología gracias al proyecto BOS2002-04182-C02-02 y a la Junta de Andalucía a través del grupo AGR-139.

[1] J. Müller, A. Wiemken, R. Aeschbacher, Plant Science (1999),147: 37-47
[2] J. Müller, Z.P. Xie, C. Staehelin, R. B. Mellor, T. Boller y A. Wiemken, Physiologia Plantarum (1994),90: 86-92
[3] J. Müller, T. Boller y A. Wiemken, Plant Science (1995),112: 1-9
[4] P. Armengaud, L. Thiery, N. Buhot, G. Grenier-de March and A. Savouré, Physiologia Plantarum (2004), 120: 442.

SIV-4

Fosfatasa ácida no específica en hojas y nódulos radicales de judía: purificación parcial y caracterización.

Ocaña, A.*, Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., y Lluch, C.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva s/n, 18071- Granada.
**aocana@ugr.es*

El fósforo es esencial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo uno de los nutrientes minerales más importantes y, a la vez, menos disponibles para las plantas, en parte por encontrarse normalmente ligado a muchos componentes del suelo. Para que pueda ser utilizado a partir de compuestos orgánicos del suelo, debe ser previamente hidrolizado por fosfatasas.

En plantas se conocen fosfatasas ácidas de muchos órganos, incluyendo hojas [3] y nódulos radicales [2]. Las fosfatasas ácidas (monoester ortofosfórico fosfohidrolasa, EC 3.1.3.2) son ubicuas en una amplia variedad de organismos animales, plantas y microorganismos. Están ampliamente distribuidas en plantas, existiendo isoformas específicas de tejidos que pueden diferir en cuanto a peso molecular, especificidad de sustrato y susceptibilidad a inhibidores [4]. Cataliza la hidrolisis de ésteres de fosfato, liberando fósforo inorgánico de sustratos fosforilados. Tienden a exhibir escasa especificidad de sustrato, y parecen ser importantes en la producción, transporte y reciclado del fosfato, provocando el aumento del "pool" de Pi. Su actividad parece aumentar en respuesta a deficiencia de fosfato, observándose cambios en isoformas específicas [1].

En este trabajo se ha estudiado la actividad fosfatasa ácida en judía crecida con 1.5 mM de fosfato o sin fosfato. Las hojas y los nódulos radicales respondieron a la ausencia de fosfato exógeno con un incremento de la actividad fosfatasa ácida. Los incrementos de esta actividad enzimática no se asociaron con la síntesis de nuevas isoformas de la enzima. Se purificaron y caracterizaron las fosfatasas ácidas que constaban de tres proteínas, una de hojas y dos de nódulos. Las proteínas de hoja mostraron un peso molecular de 72 y 51 kDa por SDS-PAGE, mientras que las de nódulos mostraron 72, 49, 41 y 34 kDa. Las enzimas de ambos órganos tuvieron un pH óptimo de 5.6 y fueron relativamente estables al calor. Las enzimas mostraron una amplia selectividad de sustrato, obteniendo la actividad máxima con α-naftil-fosfato, ribulosa 1,5-bifosfato y p-nitrofenil-fosfato. Se observó una potente inhibición por Zn^{2+}, Hg^{2+}, Cu^{2+}, Pb^{2+}, Al^{3+} and $(MoO_4)^{2-}$.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto BOS2002-04182-CO2-02 del Ministerio de Ciencia y Tecnología, y por la Junta de Andalucía a través del Grupo de Investigación AGR139.

[1]Coello P. 2002. Physiol. Plant. 116: 293-298.
[2]Penheiter A.R., Duff S.M.G., Sarath G. 1997. Plant Physiol. 114: 597-604.
[3]Staswick P.E., Papa C., Huang J-F., Rhee Y. 1994. Plant Physiol. 104: 49-57.
[4]Turner W., Plaxton W.C. 2001. Planta 214: 243-249.

SIV-5

Purificación y caracterización de la enzima trehalasa nodular de *Phaseolus vulgaris*.

Tejera, N.*, Iribarne, C., López, M., Herrera-Cervera, J.A., y Lluch, C.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada.
**natejera@ugr.es*

La enzima trehalasa ha sido caracterizada principalmente en animales [3] y hongos, especialmente levaduras [4]. En nódulos de leguminosas al parecer esta enzima tiene su origen en la planta, pudiendo considerarse como una nodulina con la función de hidrolizar la trehalosa originada por los bacteroides [2]. La trehalosa no está usualmente presente en plantas superiores, aunque se ha observado en tejidos de plantas colonizados por microorganismos, como en nódulos radicales de leguminosas, donde el microsimbionte tiene la capacidad para producir este disacárido [1]. Veluthambi *et al.* (1981)[5] encontraron que la trehalosa (común en varios organismos incluyendo bacterias, hongos y algas) puede ser tóxico para ciertas plantas y en cultivos de células vegetales, por tanto la capacidad de detoxificación de trehalosa por hidrólisis debe ser esencial para las plantas que viven en simbiosis con organismos que acumulan este sustrato.

En este trabajo, se lleva a cabo la purificación de la trehalasa de nódulos de *Phaseolus vulgaris*. Las plantas (var. Contender) cultivadas en cámara de condiciones controladas, fueron inoculadas con 1 ml de *Rhizobium tropici* CIAT899 en el momento de la siembra. A los 28 días de cultivo se procedió a la cosecha de las plantas y las muestras de nódulo se mantuvieron en congelador de –80ºC hasta la purificación de la enzima. La trehalosa purificada de nódulos de *Phaseolus vulgaris* correspondió a un polipéptido con un peso molecular estimado por filtración en geles de 48 kDa. La enzima sometida a separación en geles de poliacrilamida nativa y SDS mostró una sola banda, en el primer caso teñida por actividad y en el segundo mediante tinción con plata. La enzima purificada se caracterizó determinándose la especificidad a distintos sustratos (trehalosa, sacarosa), pH óptimo, Km para el disacárido trehalosa, así como otras características que son también comentadas.

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología gracias al proyecto BOS2002-04182-C02-02 y a la Junta de Andalucía a través del grupo AGR-139.

[1]Müller J., Xie Z.P., Staehelin C., Mellor R.B., Boller T. y Wiemken A., Physiol. Plant. (1994), 90: 86-92.
[2]Müller J., Boller T. y Wiemken A., Plant Sci. (1995), 112: 1-9.
[3]Elbein A.D., Carbohydrate Chem. Biochem. (1974), 30: 227-256.
[4]Thevelein JM., Microbiol. Rev. (1984), 48: 42-59.
[5]Veluthambi V., Mahaderan S. y Maheshirati R., Plant Physiol. (1981), 1369-1374.

SIV-6

Implicación del enzima aldehído oxidasa en la morfogénesis de los nódulos de leguminosas.

Fedorova, E.E.[1,2], Redondo, F.J.[1], Koshiba, T.[3], Pueyo, J.J.[1], de Felipe, M.R.[1], y Lucas, M.M. [1]*

[1]Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC. Serrano, 115 bis. 28006 Madrid,
[2]K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, 127276, Moscu, Rusia,
[3]Department of Biological Sciences, Tokyo Metropolitan University, Hachioji-shi, Tokyo 192-0397, Japan
**mlucas@ccma.csic.es*

Los nódulos de las leguminosas se producen por un programa de desarrollo en el que intervienen auxinas y otras hormonas (1). El papel de las auxinas, hasta el momento se ha establecido mediante experimentos de aplicación exógena de la hormona o de inhibidores del transporte de la misma (2,3). Sin embargo, poco se sabe de las vías de síntesis y de los factores que regulan los niveles de auxinas, *in vivo,* durante la morfogénesis nodular.

En plantas existen al menos tres vías de síntesis de ácido indol acético (IAA) y una de ellas, la via ácido indol pirúvico dependiente de triptófano, incluye el enzima aldehído oxidasa (AO) que convierte indol-3-acetaldehído en IAA (4).

Con el objetivo de determinar el papel del IAA, la posible síntesis *de novo* y su topología en los nódulos de leguminosas, hemos estudiado el enzima aldehído oxidasa en dos tipos de nódulos con diferentes estructuras y mecanismos de desarrollo, *Medicago truncatula* y *Lupinus albus*, éste último inducido por *Bradyrhizobium* o por *M. loti*.

Nuestros resultados indican que mediante análisis de actividad en geles es posible diferenciar la aldehído oxidasa procedente de cada uno de los simbiontes, y ambos presentan capacidad potencial de síntesis de IAA. La localización inmunocitoquímica y los experimentos de hibridación *in situ* mostraron que AO se expresa preferencialmente en la zona meristemática y de invasión de los nódulos; es decir, zona I y II del nódulo de *M. truncatula* y zona meristemática lateral de *L. albus*, y por tanto en células en las que no existen bacterias o su número es muy reducido.

En nódulos de altramuz inducidos por la cepa ZNP2037 de *Mesorhizobium loti*, que son Fix$^-$, con crecimiento restringido y senescencia temprana, la expresión del enzima fue muy baja y no se detectó ninguna actividad AO.

Nuestros resultados sugieren que es posible la síntesis *de novo* de IAA en nódulos, y ésta es debida fundamentalmente a la actividad procedente de la aldehído oxidasa de origen vegetal. Proponemos que la síntesis local de IAA en el meristemo de los nódulos, y la modulación de la expresión y/o actividad de AO es un mecanismo de autorregulación del crecimiento y desarrollo nodular.

[1]Long, S. R. 1996. Plant Cell, 8:1885-1898
[2]Boot *et al.* 1999. Mol.Plant-Microbe Interact. 12:839-844
[3]Mathesius *et al.* 1998. Plant J. 14: 23-34
[4]Seo *et al.* 1998. Plant Physiol.,116:687-693

SIV-7

Respuesta de defensa inducida en nódulos de altramuz formados por una cepa incompatible de *Mesorhizobium loti*.

Fedorova, E.E.[1,2], Pueyo, J.J.[1], de Felipe, M.R.[1]*, y Lucas, M.M.[1]

[1]Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC. Serrano, 115 bis. 28006 Madrid, [2]K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, 127276, Moscú, Rusia.
**mlucas@ccma.csic.es*

Los altramuces desarrollan nódulos de tipo lupinoide, inducidos por cepas de lento crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*). La cepa ZNP2037 de *Mesorhizobium loti*, de rápido crecimiento, también induce la nodulación y sigue mecanismos de infección semejantes a los observados con *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) [(1)], pero no da lugar a nódulos funcionales. En este trabajo hemos utilizado *Mesorhizobium loti*, cepa ZNP2037 y *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), cepa ISLU 16, para estudiar el desarrollo y la estructura de los nódulos, así como la topología de la actividad proteasa empleando el substrato fluorogénico para enzimas proteolíticas, rodamina 110, bis-(CBZ-L-fenilalanina-L-arginina amida) dihidrocloruro (RPA).

El desarrollo de los nódulos fue similar con ambas cepas en las etapas iniciales (10 días). Dieciséis días después de la inoculación los nódulos inducidos por *M. loti* eran más pequeños, debido a la desaparición de la zona meristemática, y no poseían leghemoglobina. Además, se observó un número de bacterias en las células infectadas muy reducido, la fusión frecuente de simbiosomas, y la formación de estructuras similares a vacuolas con bacteroides en su interior, que finalmente aparecían lisados y sólo sus membranas eran observables. Durante la senescencia natural nodular se produce la lisis de las bacteroides [(2)], y podría ser atribuida a la presencia de cisteina proteasa en el espacio peribacteroidal [(3)]. Finalmente se produjo la ruptura de las membranas peribacteroidales y del tonoplasto, y la degradación total de las células hospedadoras. Nuestros resultados indican que la inoculación con la cepa no homóloga produce nódulos con fenotipo Fix$^-$ y senescencia prematura. En asociaciones Fix$^-$, se producen nódulos pequeños y no funcionales, probablemente como resultado de numerosas respuestas de defensa activadas [(4)].

La actividad proteolítica con el substrato RPA (substrato de cisteina proteasas y caspasas) se acumuló fundamentalmente en las vacuolas de las células no infectadas de los nódulos inducidos por las dos cepas. En nódulos de *M. loti* la acumulación del substrato fluorogénico se encontró también en las células infectadas, en vacuolas y estructuras similares a vacuolas formadas por la fusión de membranas peribacteroidales.

En conclusión, en nódulos inducidos por *M. loti* en raíces de altramuz se produce la supresión de la simbiosis inefectiva e incremento de actividad proteasa, lo que sugiere la inducción de mecanismos implicados en reacciones de defensa y/o muerte celular programada.

[1]González-Sama *et al*, 2004. New Phytol. En prensa.
[2]Hernández-Jiménez *et al.*, 2002. Plant Physiol. Biochem. 40: 645-657
[3]Vincent y Brewin, 2000. Plant Physiol., 123: 521-530
[4]Mithofer, A.2002. Trends Plant Sci. 7: 440-444.

SIV-8

Estructura y expresión diferencial de una posible porina de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) en vida libre y en simbiosis inducida por glifosato.

de María, N.[1]*, Guevara, M. A.[2], González-Sama, A.[1], de Felipe, M.R.[1], Serra, M.T.[2], García-Luque, I.[2], y Fernández-Pascual, M.[1]

[1]Centro de Ciencias Medioambientales. CSIC. Serrano 115 dpdo. 28006 Madrid.
[2]Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Velázquez, 144. 28006 Madrid.
**nuria@ccma.csic.es*

El glifosato es uno de los herbicidas más empleados actualmente en cultivos agrícolas, por su inmovilidad, rápida inactivación y degradación en el suelo [(2)]. En trabajos anteriores [(1)], hemos comprobado que este herbicida produce un rápido descenso de la actividad fijadora de nitrógeno así como ligeras alteraciones en el patrón polipeptídico de hojas y nódulos de plantas de *Lupinus albus* cv. Multolupa, inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) cepa ISLU-16. Sin embargo, la mayor alteración encontrada fue la presencia de un polipéptido de 44 kDa (44K) en el citosol bacteroidal, que no se detectaba en el citosol de bacteroides de plantas control. Se ha llevado a cabo la identificación de esta proteína mediante la secuenciación de su región N-terminal, la caracterización de sus genes codificadores, el análisis del patrón de expresión de su mRNA y el análisis de su estructura.

El análisis de la secuencia nucleotídica de su gen codificador y de las secuencias aminoacídicas deducidas, mostraron que el polipéptido 44K posee una elevada homología de secuencia con porinas de la membrana externa de otras bacterias Gram negativas. Los ensayos de Southern del DNA genómico de la cepa ISLU-16 son indicativos de que esta proteína está codificada por un único gen en el genoma bacteriano. El patrón de expresión del gen mediante Northern de los RNA aislados de nódulos tratados con distintas dosis de herbicida, reveló una expresión constitutiva basal que se incrementa en los tratamientos con altas dosis de herbicida (5 y 10 mM), indicando que la expresión del polipéptido 44K está regulada transcripcionalmente. En la bacteria en vida libre se detectó sólo acumulación de RNA, cuando fue crecida en ausencia de glifosato, indicando diferencias en su patrón de expresión en vida libre y en simbiosis.

Finalmente, hemos analizado la estructura de la proteína 44K. Se han identificado dos motivos: uno de asociación a membrana, próximo a la región C-t y otro característico de la subfamilia de porinas, situado a 30 aa de la región N-t. La estructura secundaria contiene esencialmente lámina β y un posible dominio transmembrana β-barrel correspondiente a la cadena P de una porina específica de sacarosa, presente en proteínas de membrana externa de enterobacterias.

Actualmente se están estudiando la(s) posible(s) función(es) de esta proteína en la respuesta del microsimbionte frente al tratamiento con herbicidas.

[1]de María N., M. R. de Felipe, A. González-Sama, M. T. Serra, I. García-Luque y M. Fernández-Pascual. (2002). Glyphosate modifies the protein metabolism in *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) bacteroids. 5th European Nitrogen Fixation Conference. 8.15. Norwich. UK.
[2]Mallik, J., G. Barry and K. Kishore. (1989). The herbicide glyphosate. Biofactors 2:17:25.

SIV-9

Protección frente a estrés oxidativo mediante expresión de la proteína antioxidante flavodoxina en *Sinorhizobium meliloti*.

Redondo, F.J.*, Lucas, M.M., y Pueyo, J.J.

Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano 115-bis, 28006 Madrid.
**francisco.redondo@ccma.csic.es*

Las flavodoxinas son proteínas de pequeño tamaño y carácter ácido que transfieren electrones a bajo potencial y cuyo centro redox es un grupo flavinmononucleótido (FMN). El grupo FMN reducido reacciona fácilmente con especies de oxígeno activas y puede ser reciclado cuando se encuentra disponible una fuente de electrones adecuada. Solamente los complejos metálicos poseen una versatilidad tan alta, como ocurre en catalasas y superóxido dismutasas, pero estos complejos pueden ser destruidos en su interacción con oxidantes, mientras que las flavinas estabilizadas no son afectadas. Las flavodoxinas se han aislado de diferentes microorganismos, aunque no se han descrito en plantas superiores. La flavodoxina de la cianobacteria fijadora de nitrógeno *Anabaena variabilis* PCC 7119 es sintetizada en condiciones de deficiencia de hierro y sustituye eficazmente a la ferredoxina tanto en el trasporte fotosintético de electrones como en la reducción de la nitrogenasa.

La expresión de flavodoxina en el nódulo de leguminosas puede constituir una estrategia de protección contra el incremento del estrés oxidativo propio del proceso natural de senescencia nodular y el daño oxidativo asociado a estreses ambientales. Evaluamos la capacidad protectora de la flavodoxina en *Escherichia coli* transformada con un plásmido que da lugar a expresión del gen de la proteína de *A. variabilis*. Se obtuvo una elevada protección frente al daño oxidativo directo causado por el crecimiento de las bacterias en presencia de metilviológeno y peróxido de hidrógeno, ambos potentes agentes generadores de especies de oxígeno activas. Para la expresión de la proteína en *Sinorhizobium meliloti* en vida libre y en su forma diferenciada como bacteroide en el nódulo, se utilizó el plásmido pFAJ1709, de expresión constitutiva y estable en *S. meliloti*. Se comprobó mediante western blot la expresión de flavodoxina. Los ensayos de daño oxidativo directo a los rizobios en vida libre en presencia de metilviológeno o peróxido de hidrógeno, mostraron una protección significativa, aunque no tan destacada como en *E. coli*.

SIV-10

Estructura-función de la senescencia de nódulos de soja.

Soussi, M.[1]*, Frendo, P. [2], de Felipe, M.R.[1], y Lucas, M.M.[1]

[1]Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC. 28006 Madrid,
[2]Laboratoire de Biologie Végétale et Microbiologie, CNRS FRE 2294, Université de Nice-Sophia Antipolis, Niza, Francia
**msoussi@ccma.csic.es*

El proceso de senescencia, natural o inducida, en nódulos de raíz ha sido ampliamente estudiada en un gran número de leguminosas. Sin embargo, la mayoría de la información procede de la zona infectada y las características de la corteza durante la senescencia han sido menos estudiadas [(1,2)].

Los peroxisomas contienen moléculas y enzimas antioxidantes y por tanto, estos orgánulos están implicados en la pérdida del equilibrio redox celular, que se produce durante la senescencia. En nódulos con producción de ureidos, existen peroxisomas especializados en las células intersticiales y en la corteza interna.

Nuestro estudio se ha centrado fundamentalmente en el patrón de distribución, y alteraciones ultraestructurales, que se producen en los peroxisomas de los nódulos de soja (*Glycine max* L. Merr cv. Labrador) durante la senescencia natural. Además se ha determinado contenido de catalasa y superóxido dismutasa (SOD) (actividad, RNA).

Los resultados indican que existen diferencias en el patrón de distribución de los peroxisomas entre las células intersticiales y las células de la corteza más interna, en estados avanzados de senescencia. El área de ocupación de los peroxisomas fue significativamente superior en las células intersticiales durante la senescencia. Sin embargo, no se encontraron diferencias en las células de la corteza interna de nódulos jóvenes, maduros y senescentes.

Los transcritos de catalasa y Mn-SOD y las actividades de las dos enzimas disminuyeron durante la senescencia. Los resultados sugieren una regulación negativa de estos sistemas antioxidantes a nivel transcripcional durante este periodo. Además, el estudio citoquímico ha evidenciado que durante la senescencia, la actividad catalasa varía dependiendo de la zona estructural del nódulo, siendo significativamente más baja en la corteza interna que en la zona infectada. La disminución de la actividad total de catalasa en los nódulos, por tanto, se debería fundamentalmente a la disminución de actividad de los peroxisomas de la corteza interna, observada citoquímicamente por la disminución de la densidad electrónica de la matriz peroxisomal.

Nuestros resultados sugieren diferencias en la distribución, estructura, y actividad de los peroxisomas en la zona infectada y la corteza interna del nódulo durante la senescencia.

[1]Dalton D.A., S.L. Joyner, M. Becana, I. Iturbe-Ormaetxe, J.M. Chatfield. Antioxidant defenses in the peripheral cell layers of legume root nodules. 1998. Plant Physiol. 116: 37-43.
[2]Lucas M.M., G. Sype Van de, D. Hérouart, M.J. Hernández, A. Puppo, M.R. de Felipe. 1998. Immunolocalization of ferritin in determinate and indeterminate root nodules. Protoplasma. 204: 61-70.

SIV-11

Identificación y posible función de receptores de citoquininas en nódulos simbióticos de leguminosas.

Coba de la Peña, T.[1]*, Fedorova, E.E.[1,2], Lucas, M.M.[1], y Pueyo, J.J.[1]

[1]Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, 28006 Madrid.
[2]K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology, RAS, 127276, Moscú, Rusia.
**tcoba@ccma.csic.es*

Los receptores de citoquininas son histidina quinasas de tipo híbrido, que forman parte de un sistema de transducción de señal de dos componentes que implica transferencia intra e intermolecular de grupos fosfato entre residuos de histidina y aspartato. Se encuentran localizadas en la membrana citoplásmica. El sistema de transducción, que se activa cuando la zona extracelular sensora del receptor se une a moléculas de citoquinina, implica la fosforilación de reguladores de respuesta, y termina con la inducción o represión de genes. Hasta el momento se han identificado en *Arabidopsis* tres genes histidina quinasas que funcionan como receptores de citoquininas.

A partir de nódulos de *Lupinus albus* y *Medicago sativa*, hemos obtenido sendos clones parciales que presentan una homología del 80% con el gen histidina quinasa *AHK3* de *Arabidopsis*. Los clones corresponden a una zona del dominio transmisor de la molécula. Se observó que el nivel de expresión basal de los genes en hojas, raíces y nódulos era similar, como ocurre para *AHK3* en *Arabidopsis*. En *L. albus* se comparó la expresión del gen en meristemo y zona diferenciada de raíz, así como en nódulos en diferente estado de desarrollo. Se observó que el nivel de expresión era similar en todas las muestras, excepto en el primordio nodular, donde era netamente más débil. Esta variación de expresión del receptor puede estar relacionada con la implicación de las citoquininas en la organogénesis del nódulo. Se estudió la expresión del gen durante un proceso de senescencia nodular inducida por oscuridad. Se observó un fuerte descenso de niveles de expresión en nódulos sometidos a un día de estrés por oscuridad. Los niveles se recuperaron gradualmente a niveles de muestras control durante el segundo y tercer día de estrés por oscuridad. Algunos estudios sugieren que receptores de citoquininas y genes homólogos pueden tener una segunda función como osmosensores en plantas. A fin de estudiar la posible función osmosensora del homólogo identificado en *M. sativa*, se estudió la expresión del gen en nódulos de alfalfa sometidos a estrés salino, observándose una moderada inducción de la expresión.

SIV-12

Efecto del cadmio sobre el metabolismo de tioles en leguminosas.

Ramos, J.*, Clemente, M.R., Pérez-Rontomé, C., Loscos, J., Naya, L., Matamoros, M.A., y Becana, M.

Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apdo 202, 50080 Zaragoza.
**jramos@eead.csic.es*

El glutatión (GSH; γGlu-Cys-Gly) es un tripéptido tiólico que lleva a cabo numerosas funciones en las plantas, como la protección frente a radicales libres, el control del estado redox celular y la destoxificación de metales pesados. En algunas leguminosas, el GSH puede ser reemplazado parcial o totalmente por el homoglutatión (hGSH; γGlu-Cys-βAla). En presencia de algunos metales pesados (Cd, Pb, Hg), el GSH y hGSH actúan como precursores de las fitoquelatinas [PCs; $(\gamma Glu\text{-}Cys)_n$-Gly] y homofitoquelatinas [hPCs; $(\gamma Glu\text{-}Cys)_n$-βAla]. Los grupos tiol de estos polipéptidos forman complejos con los metales, que son transportados a las vacuolas, evitándose así los efectos tóxicos de los metales pesados sobre el metabolismo celular. En la biosíntesis de PCs y hPCs participan los enzimas γ–glutamilcisteína sintetasa (Glu + Cys => γGlu-Cys), GSH sintetasa (γGlu-Cys + Gly => GSH), hGSH sintetasa (γGlu-Cys + βAla => hGSH), PC sintasa (2-4 GSH => PC2-4) y hPC sintasa (1 hGSH + 1-3 GSH => hPC2-4).

En este trabajo preliminar hemos pretendido obtener información sobre los mecanismos de regulación de la biosíntesis de tioles en plantas. Para ello, hemos estudiado el efecto del Cd sobre los contenidos de tioles, las correspondientes actividades enzimáticas y los niveles de transcritos en la leguminosa modelo *Lotus japonicus*. Las plantas (*L. japonicus* cv Gifu x *Mesorhizobium loti* NZP2235) de 45-50 días se trataron con Cd 100 μM durante 3, 6, 24 o 96 h, y se cosecharon las raíces y los nódulos. Utilizando las (h)PCs como marcadores de Cd (ya que sólo se sintetizan cuando el Cd activa *in situ* las PC sintasas), observamos que las raíces, y no los nódulos, constituían la primera línea defensiva de la planta, y por ello los subsiguientes análisis de enzimas y transcritos se realizaron sólo en raíces.

En raíces de plantas control (no tratadas con Cd), el contenido de hGSH es unas 20 veces superior al de GSH y la hPC_3 (forma predominante) es unas 4 veces más abundante que la PC_3. Los resultados muestran importantes aumentos de γGlu-Cys (12 veces) a las 6 h de tratamiento con Cd, y de la Cys (33%), GSH (42%) y (h)PC_3 (no detectables sin Cd y 30 nmol/g con Cd) a las 24 h. Estos tioles se mantienen prácticamente constantes a los 4 días de tratamiento, excepto la hPC_3 (128 nmol/g). En estas mismas condiciones, el hGSH desciende moderadamente (10-30%), debido muy probablemente a que está siendo consumido para sintetizar hPCs. Asimismo, las actividades GSH y hGSH sintetasas se mantienen constantes hasta las 24 h y sólo se incrementan significativamente a los 4 días. El Cd aumenta el nivel de transcrito de la GSH sintetasa (6 veces) a las 3 h, que se mantiene después elevado (4-25 veces), pero no tiene efecto sobre los transcritos de la γ–glutamilcisteína sintetasa, hGSH sintetasa o PC sintasa. Los datos en su conjunto sugieren que los enzimas que intervienen en la síntesis de (h)PCs son regulados, al menos en parte, a nivel post-transcripcional en respuesta a Cd.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el proyecto AGL2002-02876 (MCyT).

SIV-13

Expresión de genes antioxidantes en nódulos de alfalfa en condiciones de estrés hídrico.

Naya, L., Ramos, J., y Becana, M.*

Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apdo 202, 50080 Zaragoza.
**becana@eead.csic.es*

El estrés hídrico inhibe rápidamente la fijación simbiótica de nitrógeno. Según la duración e intensidad del estrés, este efecto se ha atribuido, entre otros factores, al descenso de la fotosíntesis por un cierre estomático mediado por ácido abscísico, a perturbaciones del metabolismo del carbono (sacarosa sintasa) y nitrógeno (ureidos), o a la aparición de un estrés oxidativo en los nódulos.

En este trabajo hemos estudiado, a nivel molecular, la implicación de un estrés oxidativo en la pérdida de la actividad fijadora de los nódulos causada por la sequía. Para ello, se han determinado los cambios en los niveles de transcritos de los enzimas antioxidantes más importantes en ambos componentes de la simbiosis alfalfa-*Sinorhizobium meliloti*. Las plantas de alfalfa (55-58 días, periodo de crecimiento vegetativo) se dividieron al azar en tres grupos (control, estrés hídrico y recuperación, con potenciales hídricos foliares de −6, -26 y −9 MPa, respectivamente), se cosecharon los nódulos y se purificó RNA total. Se seleccionaron, entre otros, los enzimas que eliminan los radicales superóxido y el peróxido de hidrógeno en la fracción vegetal y los bacteroides de los nódulos. Se diseñaron cebadores específicos para los respectivos genes y se cuantificaron sus transcritos por RT-PCR a tiempo real.

Los resultados preliminares muestran que el estrés hídrico provoca un incremento de 2-4 veces en los niveles de transcritos que codifican CuZnSOD citosólica, MnSOD, FeSOD, ascorbato peroxidasa, catalasa y ferritina de la planta, así como de los transcritos que codifican catalasa C y MnSOD de los bacteroides. No se observaron cambios en los transcritos de CuZnSOD plastidial o catalasa A de bacteroides. En las plantas sometidas a sequía y subsiguiente recuperación durante 2 días, los transcritos volvieron a niveles control, con la notable excepción de la ferritina, que se mantuvo a niveles 4-5 veces superiores. El análisis molecular se completará con medidas de proteínas específicas (westerns) y actividades enzimáticas para determinar los mecanismos de regulación (transcripcional *versus* post-transcripcional) implicados en la respuesta de los genes al estrés hídrico.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2002-02876 (MCyT).

SIV-14

Localización de superóxido dismutasas y peróxido de hidrógeno en nódulos de alfalfa y guisante.

Clemente, M. R.[1]*, Rubio, M. C.[2], James, E. K.[3], Bucciarelli, B.[4], Vance, C.P.[4], y Becana, M. [1]

[1]Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apdo 202, 50080 Zaragoza, [2]Institute of Biology, Leiden University, 2333 AL Leiden, The Netherlands, [3] Centre for High Resolution Imaging and Processing, MSI/WTB Complex, School of Life Sciences,University of Dundee, Dundee DD1 5EH, United Kingdom, [4]Department of Agronomy and Plant Genetics, University of Minnesota, 411 Borlaug Hall, 1991 Upper Buford Circle, St Paul, Minnesota 55108, USA.
**clemente@eead.csic.es*

Las superóxido dismutasas (SODs) catalizan la dismutación de radicales superóxido a O_2 y H_2O_2, por lo que constituyen un sistema esencial de defensa antioxidante en todos los organismos aerobios. En plantas pueden coexistir tres tipos de SODs (CuZnSOD, MnSOD, FeSOD), que difieren en el cofactor metálico en su centro activo. Por otro lado, el H_2O_2 es una molécula señal y parece estar implicada tanto en el establecimiento como en la senescencia de la simbiosis rizobio-leguminosa.

En este trabajo se ha estudiado la implicación de las SODs en la producción de H_2O_2 en nódulos indeterminados. Para ello se han localizado los transcritos (hibridación *in situ* de RNA) y las proteínas (inmunolocalización) de las dos principales SODs en nódulos de alfalfa y guisante. Asimismo, se ha utilizado la técnica del cerio para localizar el H_2O_2 en los nódulos por microscopía electrónica. Finalmente, se ha determinado el efecto de diferentes inhibidores enzimáticos sobre la acumulación de H_2O_2.

El transcrito y la proteína de la CuZnSOD citosólica son más abundantes en las zonas más jóvenes del nódulo: meristemo (I), zona de invasión (II), interzona II-III y parte distal de la zona fijadora (III). Por el contrario, el transcrito y la proteína de la MnSOD se encuentran principalmente en las células infectadas de la zona III. Esta expresión diferencial sugiere que la CuZnSOD y la MnSOD desempeñan funciones específicas en el nódulo. A nivel celular y subcelular, la CuZnSOD "citosólica" se ha detectado en los cordones de infección (CI), citosol adyacente a las paredes celulares y apoplasto, mientras que la MnSOD se encuentra en las bacterias dentro de los CI, los bacteroides y las mitocondrias. Paralelamente, se han encontrado grandes cantidades de H_2O_2 en los mismas zonas del nódulo donde está presente la CuZnSOD citosólica (pero no la MnSOD), lo que sugiere que la CuZnSOD es una fuente importante del H_2O_2 en los nódulos. El H_2O_2 podría ser necesario para la polimerización oxidativa de glicoproteínas estructurales de los CI y las paredes celulares. La ausencia de H_2O_2 en los CI en nódulos preincubados con los inhibidores dietilditiocarbamato y cloruro de difenilen-iodonio indica que el H_2O_2 lo produce la CuZnSOD a partir del radical superóxido, y que éste,, a su vez, es generado por una NADPH-oxidasa (superóxido sintasa), similar a la que participa en la defensa de las plantas frente a patógenos. También se ha detectado H_2O_2 en los bacteroides senescentes (zona IV), poniendo de manifiesto que tiene lugar un estrés oxidativo durante la senescencia nodular.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2002-02876 (MCyT).

SIV-15

Inmunohistolocalización y expresión de superóxido dismutasas durante el desarrollo del nódulo en *Lotus japonicus*.

Rubio, M.C.[1]*, Becana, M.[2], y Spaink, H.P.[1]

[1]Institute of Biology, Leiden University, 2333 AL, Leiden, The Netherlands. [2]Departamento de Nutrición Vegetal, Estación Experimental de Aula Dei, CSIC, Apdo 202, 50080 Zaragoza.
**rubio@rulbim.leidenuniv.nl*

Las superóxido dismutasas (SODs) catalizan la dismutación del radical libre superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno, y constituyen una de las defensas primarias de todos los organismos frente al estrés oxidativo. En plantas se han descrito tres tipos de SODs, que difieren en el cofactor metálico en su centro activo (MnSOD, CuZnSOD y FeSOD) y en otras propiedades bioquímicas. Los tres enzimas están presentes en los nódulos y se localizan en distintos compartimentos subcelulares. En este trabajo presentamos resultados preliminares acerca de la expresión de las SODs durante el desarrollo y senescencia de los nódulos de la leguminosa modelo *Lotus japonicus*.

Utilizando anticuerpos policlonales específicos frente a la MnSOD de arroz, la CuZnSOD citosólica de espinaca y la FeSOD de *Vigna unguiculata*, hemos determinado por análisis western los niveles de las correspondientes proteínas durante el desarrollo de los nódulos de Lotus (dpi, días post-inoculación): nódulos emergentes (5-7 dpi), jóvenes (13-15 dpi), maduros (34-40 dpi) y presenescentes (50-56 dpi). Dichos análisis mostratron que la MnSOD aumenta en la transición de nódulos emergentes a jóvenes, manteniéndose elevada en nódulos maduros y presenescentes. La FeSOD también se incrementa con la edad y es más abundante en los nódulos maduros y presenescentes. Por el contrario, la CuZnSOD citosólica se encuentra preferentemente en los nódulos emergentes y jóvenes, y disminuye con la edad. Estos resultados sugieren que la CuZnSOD citosólica y la FeSOD desempeñan funciones importantes y claramente diferenciadas en la formación y en la presenescencia de los nódulos, respectivamente.

Por otra parte, se han determinado las estructuras de los genes de la MnSOD (*sodA*) y CuZnSOD citosólica (*sodCc*) de Lotus, que serán muy útiles para el subsiguiente análisis de actividad de los promotores. El gen *sodA* esta formado por seis exones mientras que el gen *sodCc* consta de ocho exones. Una observación interesante es que el primer intrón del gen *sodCc* se encuentra en la región 5´-UTR. Asimismo, se están llevando a cabo estudios de localización de las SODs, por inmunofluorescencia, en las mismas etapas del desarrollo de los nódulos descritas anteriormente. Los resultados preliminares muestran que la MnSOD se localiza en algunas células de la zona infectada en nódulos emergentes y que su concentración aumenta en las células infectadas en los nódulos jóvenes, maduros y presenescentes. Actualmente estamos llevando a cabo la inmunolocalización de la CuZnSOD citosólica y la FeSOD, cuyos resultados serán presentados en el congreso.

M.C.R. agradece la financiación de las becas postdoctorales EX2002-0425 del MECD y HPMF-CT-2002-01943 de la Unión Europea (Marie Curie Individual Fellowships). M.B. agradece la financiación parcial del trabajo mediante el proyecto AGL2002-02876 (MCyT).

Sesión V.

Aplicaciones en agricultura y medio ambiente

SV-P1

Aplicación de microorganismos beneficiosos en Agricultura y Medioambiente.

Rodríguez Navarro, D.N.*

IFAPA, CIFA-Las Torres y Tomejil. Apartado Oficial, 41200-Alcalá del Río (Sevilla)
**dulcenombre.rodríguez@juntadeandalucia.es*

Las nuevas prioridades ambientales de la Unión Europea en cuanto a la reducción del empleo de productos fitosanitarios, en general, y la mayor sensibilización social sobre el potencial peligro que su empleo indiscriminado conlleva, abre nuevas perspectivas al empleo de productos microbiológicos, sobre todo en áreas como Protección de cultivos y Biofertilizantes, más respetuosos con el medioambiente. Existe un mercado creciente, para estos productos, no sólo en la UE sino en otros países como EEUU y Canadá, aunque representa una pequeña proporción sobre el mercado general. Será necesario adquirir un conocimiento más profundo de la biología, de los mecanismos de acción, de la supervivencia en suelos y, al mismo tiempo armonizar los protocolos de evaluación de estos productos, con vistas a minimizar los posibles riesgos ambientales y para la salud humana que pudiera resultar de su liberación masiva y deliberada.

El conocimiento más profundo de la rizosfera ha cambiado algunos conceptos muy importantes en el área de la Ecología y la Fisiología Vegetal, se ha demostrado que la planta selecciona en su propio beneficio aquellas bacterias más próximas a la superficie radical, mediante los exudados radicales, de entre el conjunto de microorganismos del suelo. Estas bacterias reciben el nombre genérico de *Plant Growth Promoting Rhizobacteria* (PGPR's) [1,2]. Dentro de este amplio grupo de microorganismos beneficiosos, tanto para cultivos agrícolas como forestales, puede establecerse una clasificación en base a los efectos que inducen. Así aquellos que solubilizan o incrementan la absorción de nutrientes se les denomina *Biofertilizantes*, cabe destacar dentro de éstos a las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico en simbiosis con las leguminosas y a los hongos micorrícicos. Otro gran grupo de microorganismos que protegen a la planta o evitan el ataque de patógenos, se conoce como *Agentes de Biocontrol*. Este mismo concepto de "microorganismos rizosféricos" ha incrementado la búsqueda y permitido la selección de microorganismos con propiedades metabólicas extraordinarias, como aquellos capaces de degradar compuestos xenobióticos. Entre este amplio espectro de microorganismos beneficiosos se encuentran virus, bacterias y hongos.

El contenido de la conferencia estará basado, fundamentalmente, en ejemplos de aplicación de ***Inoculantes Microbianos*** con la finalidad de promover el crecimiento y/o proteger cultivos agrícolas; así como algunos ejemplos de su empleo en biorremediación, y por extensión, dado el ahorro de productos fitosanitarios que su empleo conlleva, su papel en la protección del medioambiente.

[1]Kloepper, et al. *Trends Biotechnol.* 7:39-43 (1989).
[2]Vessey, J.K. *Plant Soil*, 255:571-586 (2003).

SV-P2

Toxicidade dos metais pesados na simbiose *Rhizobium*-leguminosa em solos poluídos.

Castro, I.V.* e Ferreira, E.

Departamento de Ecologia, Recursos Naturais e Ambiente, E. F. N., Instituto Nacional de Investigação Agrária e das Pescas, Quinta do Marquês, 2784-505 Oeiras, Portugal.
** isabelvcastro@net.sapo.pt*

A persistência e acumulação dos metais pesados nos solos têm levado à sua contaminação, causando por isso um stress crónico nos sistemas biológicos e originando efeitos adversos na actividade, ecologia e dinâmica das populações naturais dos microrganismos do solo. As bactérias do género *Rhizobium* têm demonstrado ser altamente sensíveis à toxicidade dos metais pesados [1, 3].

Os genes que conferem a adaptação aos poluentes, incluindo aos metais pesados, encontram-se muitas vezes em plasmídeos. A correlação entre a pressão de selecção devida aos poluentes e a existência de determinados plasmídeos sugere que estes têm um papel muito importante na adaptação das bactérias aos xenobióticos. Como se sabe, as espécies de *Rhizobium* contêm geralmente além do plasmídeo simbiótico outros plasmídeos designados por "crípticos", com funções muitas vezes desconhecidas, mas que podem conferir vantagens às células que os contêm. Por outro lado, os plasmídeos podem sofrer várias modificações dentro da célula desde delecções até processos de recombinação, ou rearranjos [4] e que podem também afectar a adaptação das bactérias ao solo.

Para estes trabalhos seleccionaram-se solos de áreas industriais de Estarreja (situada na zona centro de Portugal) contaminadas por metais pesados devido à libertação de efluentes líquidos das indústrias químicas e de fertilizantes. A investigação incidiu principalmente nos aspectos ligados com a estrutura e diversidade das populações naturais de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* em 2 plantas hospedeiras, *Trifolium subterraneum* e *T. repens*, tendo-se verificado a existência de correlações entre a eficácia para a fixação de N_2 e alguns genótipos microbianos bem como a existência de alguns plasmídeos e a tolerância aos metais pesados. Permitiu ainda um maior conhecimento sobre o papel que os plasmídeos têm na sobrevivência das bactérias face ao stress causado pelos metais pesados [2].

Os resultados mostraram a existência de mudanças nos parâmetros analisados, isto é na redução da eficácia e na diversidade, o que poderá afectar a capacidade da população responder a futuros stresses servindo, por isso, como um pré-aviso antes que efeitos mais catastróficos possam ocorrer.

[1]Castro, I.V. *et al.,* (1997). *Soil Biology & Biochemistry,* 29, 1209-1213.
[2]Castro, I.V. *et al.,* (2003). *Soil Biology & Biochemistry,* 35, 49-54.
[3]Hirsch, P.R. *et al*., (1993). *Soil Biology & Biochemistry*, 25, 1485-1490.
[4]Romero, D., Palacios, R. (1997). *Annual Review of Genetics,* 31, 91-111.

SV-1

Characterization of rhizobia natural populations nodulating *Lotus corniculatus* from polluted soils.

Castro, I.V.*

Dpto. de Ecología, Recursos Naturais e Ambiente-Sector de Microbiología do Solo, Instituto Nacional de Investigaçao Agraria (INIA), Estaçao Florestal Nacional, Quinta do Marquês, Av. República, Nova Oeiras, 2784-505 Oeiras, Portugal
** isabelvcastro@net.sapo.pt*

In polluted soils, biological processes are severely impaired due mainly to the presence of toxic inorganic compounds such as heavy metals. The presence of such substances in the environment provides new selection pressures for microorganisms and led to the development of bacteria with resistance mechanisms. On the other hand, the presence of these toxic compounds has an important impact on the resident microflora which seems to be much less varied in polluted areas than in non-polluted sites. Specific adaptations to pollutants are often plasmid-borne. The correlation between the selection pressure due to pollutants and plasmid emergence suggests that plasmids play a major role in the adaptation of bacteria to xenobiotics and the acquisition of genetic traits due to pollution.

In recent years several reports have been published which document the harmful effects of long term heavy metal contamination of soils on the *Rhizobium*-legume symbiosis mainly in *R. leguminosarum* bv. *trifolii* and his host plant i.e., *Trifolium* sp. In these study we investigated the population of *Mesorhizobium loti* surviving under a metal contamination environment (very high concentrations of Hg, Zn and As) which nodulates *Lotus* sp. An important group of plasmids which are of environmental importance are those conferring resistance to heavy metals.

These symbioses (*Lotus/M. loti*) survive in rather extreme conditions and they are in equilibrium with the pollution stress and are a suitable tool to genetic analysis for bioremediation. These symbioses, through evolution, are particularly well adapted to the harsh environmental conditions such as low pH and waterlogged soils. *Lotus* species are very important for their interesting agricultural potential, their capacity to fix atmospheric nitrogen and adaptation to low input agricultural systems. Within the *Rhizobiaceae*, bacteria capable of nodulating *Lotus* species include both fast-growing (*Mesorhizobium loti*) and slow-growing (*Bradyrhizobium* spp.) strains. There are some specificity among the lotus species and their symbiontes. Previous report established that most of the *M. loti* strains harboured only one large cryptic plasmid but also no detectable plasmid could be observed in *M .loti* effective strains (Pankhurst et al., 1986). Also Monza et al., 1992, showed that out of 13 native isolates tested, 6 contained one megaplasmid (>300Mda), 4 harboured 2 large plasmids (130 Mda and >300 Mda) and no plasmid could be detected in 3 isolates. More recently, the complete genome sequence of one *M. loti* strain (MAFF303099), which hosts plants are *Lotus japonicus* and related species, have been determined (Turner *et al.*, 2002). This strain has a large circular chromosome into which the nodulation and nitrogen genes are integrated as a "symbiosis island", and two circular plasmids.

Strains of *M.. loti* so far examined exhibit symbiotic promiscuity as they establish N2-fixing associations not only with *Lotus* spp., but also with a variety of other legumes. Another characteristic of *M. loti* strains is the symbiotic effectiveness under severe acidity conditions (Jordan, 1984). *Lotus corniculatus* form effective N2-fixing nodules when inoculated with fast-growing *M. loti* species. One characteristic of fast-growing *R loti* strains is the ability to acidify the growth medium (Monza *et al.*, 1992). Slow-growing reference strain did not produce any significant change in pH medium.

There is a distinct difference in the metal sensitivity of fast and slow growing rhizobia. Slow-growing rhizobia cause an alkaline reaction within their immediate niche, thereby reducing metal solubility and activity of most metals (Alexander, 1977). Fast-growing rhizobia usually reduce the pH of their environment thereby enhancing metal availability and toxicity.

SV-2

Nitrogen fixation characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* in soil amended with sewage sludge.

Ferreira, E.*, y Castro, I.V.

Estação Florestal Nacional, Dep. Ecologia, Recursos Naturais e Ambiente, Instituto Nacional de Investigaçao Agraria (INIA), Quinta do Marquês, Av. República, Nova Oeiras, 2784-505 Oeiras, Portugal
**eugeniomferreira@net.sapo.pt*

The use of sewage sludge on agricultural land provides an economic way of disposal. The sludge contains organic matter and plant nutrients that makes it a beneficial soil amendment for crop production. Unfortunately it also contains heavy metals and other potentially toxic contaminants, which can accumulate and result in toxic effects on the soil ecosystem. Time after application of the sludge may affect the mobility of metals, when the organic matter is decomposed and sorption sites are lost, generally accompanying pH decrease, increasing the availability of heavy metals over time. Adverse effects of heavy metals on symbiotic nitrogen fixation [(1)], legume nodulation and plant growth [(2)] have been reported.

To evaluate the effects of an irradiated sewage sludge, used as a fertilizer, in a *Trifolium subterraneum* based pasture, a field experiment on a Calcaric Cambisol was established. The sludge collected from a drying bed, was applied at the rates: S1 – 5 t ha^{-1}, S2 – 10 t ha^{-1}, S3 – 20 t ha^{-1} and S4 – 50 t ha^{-1}. These rates were applied once, at the beginning of the experiment. As control, a standard mineral fertilisation (PK) equivalent to 300 kg of superphosphate (18% – P_2O_5) ha^{-1} and 60 kg of KCl (60% – K_2O) ha^{-1} was used.

One of the objectives of this investigation was to evaluate the long-term effects (five years after application) of the sewage sludge on the numbers and properties of the rhizobial population.

After five growth cycles, the numbers of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, assessed by MPN, in the soils of the different treatments, were high but not statistically different, varying from $1.23x10^6$ (S2-10 t ha^{-1}) to $2.11x10^6$ (PK) rhizobia g^{-1} of soil.
The effectiveness of the rhizobial population from the different treatments, evaluated by acetylene reduction assay, was not also statistically different varying from 33 (S4-50 t ha^{-1}) to 46 (S3 - 20 t ha^{-1}) nmol ethylene 3 $plants^{-1}$ h^{-1}. The % of N derived from fixation (Ndff) using the ^{15}N methodology confirmed these results, varying the percentage between 84% (S1- 5 t ha^{-1}) and 90% (S3- 20 t ha^{-1}).

Our results indicated that the sewage sludge, five years after application, even when applied at high rates (50 t ha^{-1}), had not significantly harmful effects on the rhizobial population of the soil.

This work was supported by FCT (POCTI/AGG/46707/2002) and FEDER.

[1]McGrath *et al.* 1988. Effects of potentially toxic metals in soil derived from past applications of sewage sludge on nitrogen fixation by *Trifolium repens* L. *Soil Biology & Biochemistry* 20: 415-424.
[2]McIlveen, W.D. and Cole, H. 1974. Influence of heavy metals on nodulation of red clover. *Phitopathology* 64: 583-589.

SV-3

Localización y distribución de Cd en plantas noduladas de altramuz.

Zornoza, P.[1]*, Vázquez, S.[1], Esteban, E.[1], Fernández-Pascual, M.[2], y Carpena, R.O.[1]

[1]Sección de Química Agrícola, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma, 28049 Madrid. [2]Departamento de Fisiología y Bioquímica Vegetal, Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC, Serrano 115 dpdo., 28006 Madrid
** pilar.zornoza@uam.es*

La presencia de elevadas concentraciones de metales pesados en suelos, es un tema que despierta, últimamente, gran interés y preocupación. Debido a su gran incidencia sobre el crecimiento vegetal y, por tanto, en la producción agrícola y por su posible inclusión en la cadena trófica. Existen grandes diferencias entre las especies en su capacidad de tolerar niveles tóxicos de metales pesados en la rizosfera. Los mecanismos de tolerancia para cada metal son poco conocidos, pero parece que están relacionados con patrones de acumulación, distribución y compartimentación en los tejidos vegetales. Así, una acumulación del metal en la raíz, restringe su transporte hacía el vástago, parte más sensible generalmente, al contaminante. La inmovilización del metal en las paredes celulares y/o su compartimentación en las vacuolas podría ser responsable de la resistencia a la toxicidad observada en algunas especies vegetales. Entre los metales pesados, merece especial atención el Cd, debido a su movilidad y a las bajas concentraciones a las que causa fitotoxicidad. Entre los cultivos, las leguminosas son relativamente tolerantes al Cd, aunque su presencia reduce la fijación de N_2 en guisante, soja, alfalfa y judía. En trabajos anteriores, se ha observado que el altramuz se ve poco afectado cuando se cultiva con dosis de Cd ≤ 18 μM [1,2]. Sin embargo, la dosis mayor de Cd causó alteraciones en la estructura de la corteza de nódulo (oclusión de espacios intercelulares con glicoproteína) y de la zona infectada (células con simbiosomas dañados) [3]. El objetivo de este trabajo ha sido profundizar en la capacidad de tolerancia que tiene esta leguminosa mediante inmovilización o compartimentación de Cd. Para ello, plantas de *Lupinus albus* cv. Multolupa, inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. (Lupinus) cepa ISLU-16, fueron cultivadas en invernadero, mediante hidroponía con substrato (perlita) y tres disoluciones nutritivas con distintas dosis de Cd (0, 60 y 150 μM). A los 35 días del inicio del tratamiento, el efecto del metal pesado sobre la distribución de Cd en parte aérea, raíz y nódulos fue evaluado mediante criotécnicas asociadas a microscopía electrónica de barrido, utilizando criofijación seguido de fractura en congelación y microanálisis de rayos X de elementos. El crecimiento y la nodulación de las plantas de altramuz no se han visto modificados de forma significativa por la dosis de Cd aportada. El microanálisis de rayos X pone de manifiesto que el Cd se localiza en las paredes celulares del cortex radicular, menos intensa a medida que nos aproximamos a la estela. En las paredes de las células de la corteza de nódulo, se deposita Cd y también en las de la zona infectada. Las vacuolas tanto de la raíz como de los nódulos sólo presentan valores traza.

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del Proyecto MCyT REN2001-113-CO2 y la Fundación Areces.

[1] Carpena, R.O., López, S., Zornoza, P. (2000). Consj. Agric. Agua y Medio Ambiente, Murcia, 2000, pp. 269-276.
[2] Zornoza, P., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pascual, M., Carpena, R.O. (2002). Plant Physiol. Biochem. 40: 1003-1009.
[3] Carpena, R.O., Vázquez, S., Esteban, E., Fernández-Pascual, M., de Felipe, M.R, Zornoza, P (2003). Plant Physiol. Biochem. 41: 911-919

SV-4

La simbiosis *Rhizobium*-leguminosa como herramienta para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados.

Pajuelo, E.[1], Carrasco, J. A.[2], Armario, P.[1], Zacchi, L.[1], Caviedes, M. A.[1], Chamber, M. A. [2], y Palomares, A. J. [1]*.

[1]Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 41012 Sevilla.
[2]Centro de Investigación y Formación Agraria C.I.F.A. Las Torres-Tomejil, D.G.I.A., Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. 41200 Alcalá del Río. Sevilla
**palomares@us.es*

El derramamiento de desechos mineros a partir de balsas contenedoras es un problema medioambiental grave. En Abril de 1998 tuvo lugar uno en Aznalcóllar cuando la pared de la balsa cedió y se contaminaron aproximadamente 2000 hectáreas de tierras de cultivo a lo largo de los valles de los ríos Agrio y Guadiamar. Se liberaron una masiva cantidad de aguas ácidas y lodos conteniendo elementos metálicos tales como cinc, plomo, arsénico, cobre, antimonio, cobalto, talio, bismuto, cadmio, plata, mercurio y selenio. Los lodos se retiraron como parte de una acción mitigadora urgente. Hasta el día de hoy, cinco años después del desastre, la concentración de elementos tóxicos en el suelo permanece elevada, a pesar de los esfuerzos realizados para la limpieza de la zona y la aparente degradación. Sin embargo, algunas especies de plantas, entre las que las leguminosas están en elevada proporción, han colonizado este área contaminada. Dichas leguminosas muestran nódulos fijadores de nitrógeno en sus raíces. Nuestro objetivo ha sido el usar la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa como herramienta para la biorremediación del área afectada. Hemos aislado alrededor de unas cien cepas de *Rhizobium* de las que 41 son resistentes a elevadas concentraciones de As (300mg/l), Cu (100mg/l) y Pb (500mg/l). Sus fenotipos y potencial bioacumulador se han caracterizado por su capacidad para crecer en medios de cultivo adicionados con arsénico y metales pesados. La presencia de los genes de resistencia en alguna de estas cepas se ha confirmado por PCR e hibridación. Algunas de estas cepas son simbióticamente efectivas en suelos contaminados. Por otro lado, parece ser que los primeros pasos de formación del nódulo se ven mas afectados que la capacidad para fijar nitrógeno. La caracterización de los *Rhizobium* resistentes usando diferentes metodologías y el estudio de las propiedades simbióticas en presencia de elementos contaminantes se presentan y discuten en esta comunicación.

SV-5

Análisis fitorremediador de leguminosas silvestres de la cuenca del rio Guadiamar.

Armario, P.[2], Carrasco, J.A.[1], Pajuelo, E.[1]*, Palomares, A.J.[2], y Chamber, M.A.[1]

[1]Centro de Investigación y Formación Agraria C.I.F.A. Las Torres-Tomejil, D.G.I.A., Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. 41200 Alcalá del Río. Sevilla.
[2]Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. 41012 Sevilla.

El 25 de Abril de 1998, una brecha de algo mas de 50 metros de anchura se abre en la cara este del dique que configura la balsa de decantación que la empresa Boliden-Apirsa tenia en la explotación pirítica de Aznalcóllar. Esta rotura ocasionó el vertido de aproximadamente 2000 millones de litros de lodos y otros 4000 millones de aguas ácidas, con una elevada concentración de metales pesados (zinc, plomo, arsénico, cobre, antimonio, talio y cadmio) al rio Guadiamar [1, 2]. Como consecuencia de ello, resultó afectado un tramo fluvial de unos 62 Km de longitud desde la mina hasta el límite con el Parque Nacional de Doñana. Numerosos grupos de investigación han realizado esfuerzos tratando de paliar el accidente acaecido. Las distintas estrategias de biorremediación de suelos contaminados por metales pesados emplean organismos vivos, microorganismos y plantas (fitorremediación) para recuperar el ecosistema. Hoy en día se conocen al menos 45 familias de plantas que contienen especies capaces de acumular metales. Diferentes trabajos en áreas contaminadas por metales pesados y arsénico han permitido identificar especies silvestres con gran potencial en la extracción de estos contaminantes del suelo [3, 4]. Sin embargo, la mayoría de las plantas silvestres hiperacumuladoras son de crecimiento lento, producen muy poca biomasa y se desconocen sus prácticas agronómicas. El uso de especies cultivadas presenta las ventajas de utilizar plantas adaptadas a las condiciones edáficas y climáticas de la zona, de las que se conoce su manejo agronómico. El objetivo del presente trabajo ha sido aislar leguminosas autóctonas de la cuenca del río Guadiamar con capacidad de acumular/detoxificar metales pesados. La utilización de las leguminosas como planta fitorremediadora, no solo permite la limpieza del suelo sino el enriquecimiento del mismo en nitrógeno de una manera sostenible. Se han aislado unas 30 especies de plantas leguminosas pertenecientes a 6 géneros (*Medicago*, *Trifolium*, *Ornithopus*, *Lupinus*, *Melilotus* y *Biserrula*), de todos ellos *Medicago* es el mas representado. Se ha determinado la acumulación de metales pesados en distintos tejidos de estas leguminosas recolectadas en la zona. La acumulación depende de la especie y de la concentración de metales en el suelo. Hay elementos que se translocan fácilmente a la parte aérea, mientras que otros como el arsénico queda acumulado en la raíz. Todos estos resultados se discuten en la presente comunicación.

[1]Ayora, C., Barettino, D., Carrera, J., Manzano, M., Mediavilla, C. Las aguas y los suelos tras el accidente de Aznalcollar. Boletín Geológico y Minero. 2001. 112:1-294.
[2]Grimalt J.O., Macpherson, E. The mine tailing accident in Aznalcollar. The Science of the Total Environment. 1999. 242: 3-11.
[3]Haro, A. de., Pujadas, A., Polonio, A., Font, R., Montoro, R. and Del Rio, M. Phytoremediation of polluted soils after the toxic spill of Aznalcollar mine using wild species collected in situ. Fresenius Environmental Bulletin. 2000. 9: 275-280.
[4]Ma, L.Q., Komar, K. M. Tu, C., Cai, Y., Kennelley, E. D. A fern that hyperaccumulates arsenic. Nature. 2001. 409: 579.

SV-6

Evaluación de la idoneidad de sustratos para la elaboración de inoculantes microbianos.

Temprano, F.J.[1]*, y Albareda, M.[1]

[1]Instituto de Investigación y Formación Agroalimentaria y Pesquera. CIFA Las Torres y Tomejil. Ctra. Sevilla-Cazalla, Km. 12,2. 41200 Alcalá del Río (Sevilla).

Gran parte de los inoculantes microbianos empleados en la agricultura se formulan empleando sustratos sólidos de diversa naturaleza (3). En el caso de *Rhizobium* y otras bacterias gram negativas el sustrato más utilizado es la turba que ha dado resultados muy positivos (3). Sin embargo, en ocasiones, la turba presenta algunos inconvenientes o no está disponible y es preciso contar con otros sustratos alternativos que puedan ser utilizados por la industria.

Se ha estudiado la adecuación de algunos soportes para la elaboración de inoculantes con las estirpes de *Sinorhizobium fredii* SMH12 y de *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. Se emplearon los sustratos minerales perlita, atapulgita y sepiolita y los sustratos orgánicos orujo de uva y fibra de coco, en comparación con la turba negra de Padul ya utilizada con éxito en la preparación de inoculantes.

Se analizaron previamente algunas características físico-químicas de los soportes que pudieran tener interés para su adecuación en la preparación de los inóculos, como humedad residual, salinidad, pH, densidad aparente y se determinaron las curvas características de retención de humedad. Los sustratos se molieron finamente hasta una granulometría media de 70μ y en el caso de la atapulgita y la fibra de coco, se ajustó el pH a la neutralidad. Los sustratos, en bolsas de polietileno de galga 200μ, se esterilizaron por corriente acelerada de electrones (25 Mrads).

Las estirpes bacterianas se multiplicaron en un medio líquido de manitol-extracto de levadura (1), hasta alcanzar concentraciones superiores a 5 x 10^9 ufc/ml, y se mezclaron con los sustratos estériles en una proporción tal que la humedad final del inoculante estuviera en un rango de pF 2,5-3,5. Los inoculantes así preparados se almacenaron a temperatura de 25ºC.

A lo largo de un periodo de 4 meses se ha estimado la concentración de bacterias viables en los inoculantes mediante recuento de colonias en placa. Los resultados han mostrado que la turba y la perlita mantiene poblaciones de *Rhizobium* superiores a 10^9 ufc/g al final de ese tiempo de almacenamiento. La atapulgita y la sepiolita mostraron, al cabo de 4 meses, densidades del orden de 5 x 10^8 ufc/g para la estirpe SMH12 e inferiores a 10^8 ufc/g en el caso de la estirpe USDA110. En los sustratos orujo de uva y fibra de coco las poblaciones de ambas estirpes disminuyeron drásticamente al cabo de 2 semanas de almacenamiento, indicando su mala adecuación como soportes para esos microorganismos.

[1] Alvárez, A. y cols. (1970). Proc. V Reunión Latinoamericana de *Rhizobium*. Río de Janeiro. p. 1-6.

[2] Paau, A.S. (1998). Formulation of beneficial organisms applied to soil p. 235-254. En: Formulation of microbial biopesticides. H.D. Burguess ed. Kluwer Academic Pub.

[3] Roughley, R.J., (1970) Plant and Soil 32, 675-701.

SV-7

Fijación de N_2 en los arrozales del Delta del Ebro.

del Cueto, A.*, Aburto, J., Martín, D., Nuñez, F. J., Quesada, A., y Fernández Valiente, E.

Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049-Madrid.
**xinzo75@yahoo.es*

Las cianobacterias fijadoras de nitrógeno están presentes en la mayor parte de los arrozales del mundo. Pueden localizarse en la superficie del suelo, en la columna de agua, o epifíticas sobre la planta de arroz y otros macrófitos. Estos organismos, con su actividad fijadora de nitrógeno atmosférico contribuyen a la fertilidad natural del suelo.

En años anteriores se ha estudiado y puesto de manifiesto la importancia de las cianobacterias fijadoras de N_2 para el mantenimiento de la fertilidad del suelo y la productividad del arroz en los arrozales de Valencia [1, 2, 3]. En el presente trabajo se estudia la presencia de cianobacterias y su capacidad de fijación de N_2 en los arrozales del Delta del Ebro.

Con este objetivo se seleccionaron cuatro campos experimentales en las proximidades de Amposta (Tarragona): dos de ellos de suelos predominantemente arcillosos y los otros dos de suelos predominantemente arenosos. En todos los casos, los campos habían sido abonados con 120 Kg N/ha. Se realizaron 3 muestreos en los meses de Junio, Julio y Agosto de 2003. En cada muestreo se tomaron muestras de suelo y de macrófitos para determinar la posible presencia de cianobacterias fijadoras de N_2 mediante observación directa con el microscopio de fluorescencia y crecimiento en placa en medio sólido. El contaje de cianobacterias en suelo y en planta se realizó mediante técnicas fluorimétricas. La fijación de N_2 se determinó mediante la técnica de reducción de acetileno, siguiendo la metodología previamente descrita para los arrozales de Valencia [3].

Los resultados indican la presencia de cianobacterias fijadoras de N_2 en todas las muestras de suelo, en cantidades similares a las registradas en años anteriores en los arrozales de Valencia. Así mismo se registró la presencia de cianobacterias epifíticas sobre la macroalga *Chara vulgaris*, que estaba sólo presente en dos de los cuatro campos experimentales. En todos los muestreos y campos experimentales se detectó actividad fijadora de N_2, con valores algo inferiores a los detectados en los arrozales de Valencia.

[1] Carreres, R., González-Tomé, R., Sendra, J., Ballesteros, R. Fernández Valiente, E. Quesada, A., Nieva, M. y Leganés, F. (1996) Effect of nitrogen rates on rice growth and biological nitrogen fixation . *J.Agric.Sci.*127:295-302.

[2] Fernández Valiente, E., Ucha, A. Quesada, A., Leganés, F. y Carreres, R. (2000) Contribution of N_2 fixing cyanobacteria to rice production: availability of nitrogen from ^{15}N-labelled cyanobacteria and ammonium sulphate to rice. *Plant and Soil* (221:107-112.

[3] Quesada, A., Leganés, F. y Fernández Valiente (1997) Environmental factors controlling N_2 fixation in mediterranean rice fields. *Microbial Ecol.* 34:39-48.

SV-8

Construcción de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* para rizorremediación de PCBs, utilizando sistemas de regulación nod.

Villacieros, M.[1], Sánchez-Contreras, M.[1], Martín, M.[1], Aguirre de Cárcer, D.[1], Dowling, D.[2], Karlson, U.[4], Mackova, M.[3], y Rivilla, R.[1]*.

[1]Departamento de Biología. Universidad Autónoma de Madrid. 28049 Madrid, [2]Department of Applied Biology & Chemistry, Institute of Technology Carlow, Carlow, Irlanda, [3]Universidad Química y Técnológica. Praga. República Checa, y [4]Dept. of Environmental Chemistry & Microbiology, National Environmental Research Institute, Roskilde, Dinamarca.
**rafael.rivilla@uam.es*

La rizodegradación de compuestos orgánicos requiere un alto nivel de expresión de los genes implicados en la biodegradación, en estirpes bacterianas que sean excelentes colonizadoras de la rizosfera. *Pseudomonas fluorescens* F113 es una cepa con capacidad de biocontrol que coloniza la rizosfera de numerosas plantas, incluida la alfalfa. Para diseñar un sistema de expresión que permitiera un alto nivel de expresión en la rizosfera, hemos probado diversas construcciones basadas en promotores de los genes *nod* de *Sinorhizobium meliloti*. Estos promotores han sido probados en la cepa F113 mediante fusiones transcripcionales con el gen que codifica la ß-galactosidasa. Este análisis ha mostrado que la nodbox 4 de *Sinorhizobium meliloti* muestra un alto nivel de expresión en F113 dependiente de la presencia del gen *nodD1* .Una fusión transcripcional de un cassette nod, conteniendo el gen *nodD1* y la nodbox 4, fusionado a un gen *gfp* mostraba un alto nivel de expresión en la rizosfera de alfalfa. El operón *bph* de *Burkholderia Sp*. LB400 se clonó bajo el control del cassette nod y se insertó mediante un transposón en el genoma de F113, generando la cepa F113L::1180, que tiene una copia única de esta construcción. Esta nueva cepa no difiere de F113 en su capacidad de biocontrol y colonización de la rizosfera. Además, la cepa no contiene genes de resistencia a antibióticos y muestra un alto grado de actividad enzimática BphC. La cepa modificada es capaz de crecer usando bifenilo como única fuente de carbono y energía con una tasa de crecimiento más de tres veces mayor que otro derivado de F113 (F113pcb), que expresa los genes *bph* a partir de su propio promotor. La degradación de PCB-3, utilizado como modelo, era mucho más rápida en F113L::1180 que en F113pcb. Finalmente, la cepa F113L::1180, co-metabolizó una mezcla compleja de PCBs mejor que la cepa LB400, de la que se habían aislado los genes *bph* utilizados en este estudio.

SV-9

Desarrollo de nuevos inoculantes de *Rhizobium* por incorporación del sistema de oxidación de hidrógeno.

Ureta, A.C.[1]*, Muñoz, S.[3], Imperial, J.[1,2], Ruiz-Argüeso, T.[1], Sanjuan, J.[3], y Palacios, J.M.[1]

[1] Departamento de Biotecnología, Unidad de Microbiología, [2] Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria s/n 28040 Madrid
[3] Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada
** aureta@bit.etsia.upm.es*

La hidrogenasa de *Rhizobium leguminosarum* oxida el hidrógeno generado en el proceso de fijación biológica de nitrógeno en nódulos de leguminosas minimizando la pérdida de energía que ocurre en el proceso. Este reciclado de hidrógeno se ha asociado a un aumento de la productividad de las leguminosas. Los determinantes genéticos del sistema hidrogenasa de *R. leguminosarum* bv viciae UPM791 se han identificado en una región de 15 Kb del plásmido simbiótico. Esta región incluye 18 genes (*hupSLCDEFGHIJKhypABFCDEX*) implicados en la síntesis de la hidrogenasa. Sin embargo, sólo un limitado número de cepas de *Rhizobium* posee este sistema de reciclado de H_2. Con el propósito de mejorar cepas de *R. leguminosarum* útiles como inoculantes, se ha introducido el transposón TnHB100, que contiene estos genes, en las cepas Rlv21 y Rlv13 aisladas de veza (*Vicia sativa*). Se procedió a la localización del sitio de inserción mediante el clonaje del DNA adyacente a la inserción y posterior secuenciación del mismo, y se seleccionaron transconjugantes de cada cepa en los que el transposón se ubicaba en sitios que se preveía no afectaban a funciones relevantes para la simbiosis. En estos transconjugantes se está analizando el efecto de la capacidad de reciclado de H_2 sobre el comportamiento simbiótico. Ensayos preliminares, realizados con un derivado de la cepa Rlv13 portador de una inserción de TnHB100 en una región intergénica, han permitido demostrar la existencia de incrementos significativos en fijación de N_2 asociados a la presencia de dicho transposón.

Un factor fundamental en la expresión de la hidrogenasa en nódulos es el suministro de Ni al bacteroide, ya que la incorporación de este elemento al centro activo de la enzima es un paso esencial en la síntesis de la enzima. Se ha estudiado si la disponibilidad de Ni de los suelos es un factor limitante de la actividad hidrogenasa en nódulos de leguminosas. Se seleccionaron 8 suelos representativos de la Comunidad de Madrid, que se emplearon como sustrato para el crecimiento de guisantes inoculados con la cepa *R. leguminosarum* bv. viciae UPM791. El análisis del metabolismo de hidrógeno en los bacteroides de estas plantas demostró que el Ni presente en estos suelos no es suficiente para reciclar el 100% del H_2 producido en el proceso de fijación de N_2. Esta limitación se puede eliminar agregando Ni al suelo o utilizando cepas modificadas que inducen mayor actividad hidrogenasa.

SV-10

TGGE aplicado al estudio de la biodiversidad de bacterias desnitrificantes y oxidadoras de amonio en biopelículas de filtros sumergidos para el tratamiento de aguas residuales urbanas.

Gómez-Villalba, B.[1]*, Calvo, C.,[1,2], Rodelas, B.[1], y González-López, J.[1, 2]

[1]Instituto del Agua, y [2]Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia Universidad de Granada, 18071 Granada.
**beag_v@ugr.es*

La técnica TGGE, independiente de cultivo, se ha aplicado en este trabajo a la monitorización de la distribución temporal y espacial de las comunidades oxidadora de amonio y desnitrificante en una planta piloto para el tratamiento de aguas residuales urbanas. El sistema consta de dos filtros sumergidos, trabajando en modo de pre-desnitrificación. Como marcadores para el estudio, se han empleado dos genes funcionales: para las bacterias nitrificantes de fase I de la subclase Beta-Proteobacteria, el gen que codifica la subunidad α de la enzima amonio-monooxigenasa (*amoA*), y para las bacterias desnitrificantes, el gen que codifica la enzima óxido nitroso reductasa (*nosZ*). A partir de muestras de ADN total extraídas de las biopelículas, se han amplificado mediante PCR fragmentos de ambos genes de un tamaño adecuado para la separación mediante TGGE (475 bp para *amoA* y 250 bp para *nosZ*), empleando parejas de cebadores universales previamente descritos [(1,3)].

Los perfiles de TGGE obtenidos han mostrado la presencia de bacterias tanto oxidadoras de amonio como desnitrificantes en ambos lechos de la planta (anóxico y aeróbico). Los perfiles de la comunidad desnitrificante permanecieron estables en el tiempo y el espacio, mientras que los de las bacterias oxidadoras de amonio variaron considerablemente. Las bandas separadas mediante TGGE se reamplificaron y secuenciaron, permitiendo el estudio filogenético de ambas comunidades en las biopelículas. La filogenia basada en a*moA*/AmoA reveló la prevalencia de las especies de *Nitrosomonas* en el sistema estudiado, con 5 secuencias afiliadas a *N. oligotropha*, 6 a *N. europaea*, y 3 que mostraron sólamente un 75,7-76,1% de identidad de la secuencia de ADN con la especie descrita más próxima (*N. nitrosa*). Este porcentaje es indicativo de especies no descritas previamente [(2)]. Se obtuvieron 18 secuencias nuevas de *nosZ*, si bien muchas de ellas fueron redundantes, debido a la formación de heterodúplex causada por el empleo de cebadores degenerados para la amplificación. La mayoría de las secuencias de *nosZ* obtenidas se relacionaron con las de Gamma-Proteobacterias del género *Pseudomonas*, y el resto se agruparon en la periferia de secuencias de las Alfa-Proteobacterias *Bradyrhizobium* y *Azospirillum*.

Esta investigación ha sido financiada por el MCYT (proyecto AMB99-0666-C02-01). El trabajo de B. Gómez Villalba y B. Rodelas ha sido financiado mediante ayudas de los Programas FPI (MCYT) y Ramón y Cajal (MCYT), respectivamente.

[1]Nicolaisen, MH y Ramsing, NB, 2002, *J. Microbiol. Methods* 50:189-203.
[2]Purkhold U. et al, 2000, *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5382-5386.
[3]Scala, DJ y Kerkhof, MJ, 1998, *FEMS Microbiol. Lett.* 162:61-68.

SV-11

Efecto de la interacción entre CO_2, temperatura y sequía en la actividad nodular de plantas de alfalfa.

Aranjuelo, I.*, Erice, G., Irigoyen, J.J., y Sánchez-Díaz M.

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultades de Ciencias y Farmacia, Universidad de Navarra, C/ Irunlarrea s/n, Pamplona (España).
**iaranjuelo@yahoo.es*

El nitrógeno es el elemento mineral que con mayor frecuencia limita el desarrollo vegetal. A la hora de analizar el efecto del Cambio Climático sobre las plantas fijadoras de N_2, se ha postulado que el aumento de CO_2 atmosférico podría estimular la fijación de N_2. Sin embargo, hay autores que han constatado un empobrecimiento en N de las plantas crecidas en ambientes de CO_2 elevado, causado por desajustes en la relación C/N. El objetivo del presente estudio ha sido analizar el efecto de la interacción CO_2, temperatura y sequía sobre la fijación de N_2 de plantas noduladas de alfalfa crecidas en condiciones naturales. Para la consecución de este objetivo se emplearon túneles de gradiente térmico, colocados sobre un cultivo de alfalfa. Se utilizaron plantas de alfalfa de un mes de edad, inoculadas con *Sinorhizobium meliloti* 102F78. Las plantas se dispusieron en el interior de los túneles, en macetas de 13 litros de capacidad incluidas en el terreno. Como substrato se empleó una mezcla de perlita/vermiculita 2/1 (v/v). Se realizaron ocho tratamientos en función de la concentración de CO_2 (ambiente ó 700 μmol mol^{-1}), temperatura (ambiente ó ambiente +4ºC) y disponibilidad hídrica (control o sequía). La sequía se consiguió reduciendo el contenido volumétrico de agua del suelo de las macetas a un 50% del control. Al cabo del mes de tratamiento se realizó una cosecha a partir de la cual se analizó la concentración de N total, la producción de materia seca nodular, la actividad nodular específica, las actividades enzimáticas malato deshidrogenasa, fosfoenolpiruvato carboxilasa, glutamato-oxalacetato transaminasa e isocitrato deshidrogenasa, así como los contenidos nodulares de proteínas y azúcares solubles totales y de almidón. El análisis del N total reveló que el CO_2 elevado, lejos de estimular sus valores, o bien no tuvo efecto o el efecto fue negativo. Teniendo en cuenta que las plantas crecidas a 700 μmol mol^{-1} CO_2 tuvieron una mayor producción de materia seca nodular, los resultados obtenidos sugieren que estas plantas lograron mantener niveles controles de N gracias a una mayor inversión en materia seca nodular que, sin embargo, resultó ser menos eficiente, aspecto confirmado por las determinaciones de la actividad nodular específica. El estudio del metabolismo nodular mostró que el CO_2 elevado, salvo en el caso de las plantas sometidas a sequía y temperatura elevada, redujo la actividad enzimática a consecuencia de una disminución en las proteínas solubles totales. Las plantas del tratamiento de sequía y temperatura elevada lograron mantener actividades controles gracias a que las proteínas solubles totales no se vieron afectadas por la concentración de CO_2. La menor disponibilidad de carbohidratos pudo contribuir al deterioro de la actividad nodular.

Agradecimientos: Al IRNA-CSIC (Salamanca) y en especial a los doctores Rafael Martínez-Carrasco y Pilar Pérez por su colaboración y asesoramiento. Este trabajo fue financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (BFI2000-0154; FP200-52313), Comisión de Ciencia y Tecnología (AMB96-0396) y Fundación Universitaria de Navarra.

SV-12

Previous studies on the effects of combined inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium hedisari* on Sulla (*Hedysarum coronarium* L).

Barbera, A.C.[1]*, Lluch, C.[2], y Fiscella, T.[1].

[1]*Dipartimento di Scienze Agronomiche, Agrochimiche e delle Produzioni Animali (DACPA), Facolta' di Agraria, Universita' degli Studi di Catania, 95123 Catania (Italy).*
[2]*Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, 18071 Granada.*
**ac.barbera@unict.it*

Sulla (*Hedysarum coronarium* L.), also known as French Honeysuckle, Sweet Vetch, Italian and Spanish sainfoin, belong to the genus *Hedysarum*, family Fabaceae subfamily Faboideae tribe Hedysareae, also placed in Papilionaceae.

Originated in Mediterranean region it is used for forage production in semi-arid and arid regions, and it is relevant for grazing, silage, hay or green feed in southern Italy where about 250.000 ha grown.

Sulla is medium tolerance plant to drought, but it is not tolerant to flooding, require soils with pH higher than 6.0-6.5, and adequate P availability. Concerning rhizobial relationships, seed inoculation is required only when sown in soils without a previous history of growing sulla, requiring a specific strain of *Rhizobium hedisari* for effective nodulation. Under semi-arid conditions in southern Italy and Sardinia, 6-7 t/ha have been easily achieved from sulla pastures grazed by dairy sheep. Good-quality hay can be made if cut is done at the flowering stage rather than the traditional seed pod stage, while good-quality wilted silage can be made because of sulla's high water-soluble carbohydrate content.

The present work has shown the effects of the inoculation of sulla (*Hedysarum coronarium* L.) seedling with *Azospirillum brasilense* strain Cd with or without a *Rhizobium hedisari* indigenous strain. In greenhouse experiment the plant were cultivated in pots filled with soil with poor nitrogen and phosphorus content, which was used for durum wheat cultivation, with low content of sulla natural rhizobium strain. Inoculation with *A. brasilense* plus rhizobium significantly enhanced the root nodules number and shoot dry weight at 82 and 98 days after sowing (das) sampling, comparing with the other treatments. However, *azospirillum* inoculation has shown a significant lowest nodules number at each harvest time (82, 98, and 118 das). At final harvest time (118 das), before plant flowering, the higher number of root nodules were found both in plants inoculated with the two bacteria and with indigenous rhizobium strain, which has also shown the significant higher shoot nitrogen content, comparing to all the other inoculation treatments.

[1]Hamaoui, B., et al. - 2001 Agronomie 553-560

SV-13

Mejora de la tolerancia de *Rhizobium etli* a salinidad y su efecto sobre la simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.

Domínguez-Ferreras, A.[1], Tejera, N.[2], Herrera-Cervera, J.A.[2], Soto, M.J., Olivares, J.[1], Lluch, C.[2], y Sanjuán, J.[1]*

[1] Dpto. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos. Estación Experimental del Zaidín-CSIC. Prof. Albareda 1, 18008 Granada.
[2] Dpto. Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada. Campus Fuentenueva, s/n, 18071 Granada.

El incremento de los niveles de salinidad en los suelos cultivados es uno de los mayores problemas a los que se enfrenta la agricultura actual. Son bien conocidos los efectos negativos que este estrés abiótico tiene sobre el rendimiento de la fijación de nitrógeno en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, afectando tanto a la formación y desarrollo de los nódulos como al metabolismo carbonado y nitrogenado en los mismos. Una mejora de la tolerancia de la simbiosis al estrés salino requiere probablemente la mejora de la capacidad adaptativa de ambos simbiontes, bacteria y planta. En *R. tropici* se ha evidenciado una correlación entre la capacidad de adaptación a estrés salino y la eficiencia de fijación simbiótica de nitrógeno [(1)].

En este trabajo se ha abordado la mejora de la tolerancia de la bacteria al estrés salino, mediante la identificación de mutaciones que conllevan un aumento de la tolerancia a altas concentraciones de sal. Usando *R. etli* como modelo, hemos identificado 3 grupos de genes cuya inactivación determina una mayor capacidad de adaptación de la bacteria a estrés salino bajo condiciones de laboratorio. Un grupo de genes, representado por 3 mutantes independientes, lo constituyen 2 Orfs de función desconocida, con homología a proteínas de membrana presentes en otras bacterias. El segundo grupo lo constituyen genes *nuo*, implicados en la formación y actividad de la NADH ubiquinona oxido-reductasa, que participa en los primeros pasos del proceso de fosforilación oxidativa. Por último, un tercer grupo de mutantes tienen en común su participación en distintos pasos metabólicos de la formación de poliprenilos. La correlación entre genotipo y fenotipo ha sido verificada en la mayoría de las mutaciones caracterizadas. De manera general, la mayor tolerancia a salinidad provocada por las distintas mutaciones no conlleva una mayor tolerancia a estrés osmótico, como el provocado por altas concentraciones de sacarosa, lo que sugiere que los fenotipos observados son específicos de tolerancia a cloruro sódico. El efecto de distintas mutaciones sobre la eficiencia de fijación de nitrógeno de *R. etli* en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* será discutida.

Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto de investigación coordinado BOS2002-04182-C02, concedido por el MCyT a C. Lluch y J. Sanjuán.

[1]Nogales J, Campos R, BenAbdelkhalek H, Olivares J, Lluch C & Sanjuán J. (2002). *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing simbiosis with *Phaseolus vulgaris*. Mol. Plant-Microbe Interact. 15: 225-232.

SV-14

Cometabolismo diazotrófico de compuestos nitroaromáticos en la bacteria fijadora de nitrógeno *Rhodobacter capsulatus* B10.

Pérez-Reinado, E.[1], Blasco, R.[2], Moreno-Vivián, C.[1], Castillo, F.[1]*, y Roldán, M.D.[1]

[1]Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Severo Ochoa, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba. 14071- Córdoba. [2]Dpto. de Bioquímica, Biología Molecular y Genética. Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura. 10071 – Cáceres.

Los compuestos nitroaromáticos son xenobióticos producidos por la industria, como intermediarios en la síntesis de plaguicidas, fármacos, tintes y explosivos. Mientras que los mononitrofenoles son degradados mediante rutas aeróbicas, los polinitrofenoles lo son por vías reductivas. Esta reducción puede llevarse a cabo directamente sobre el anillo aromático [1,2], o sobre los grupos nitro [3]. La bacteria fijadora de nitrógeno *Rhodobacter capsulatus* B10 fotorreduce el 2,4-dinitrofenol (DNP) y el 2,4,6-trinitrofenol (ácido pícrico). El DNP se transforma en 2-amino-4-nitrofenol que se acumula en el medio en cantidades estequiométricas [4]. El ácido pícrico se reduce a 2-amino-2,6-dinitrofenol (ácido picrámico) que se transforma rápidamente en otros compuestos aún sin identificar. Ambos procesos de transformación son llevados a cabo por una nitrorreductasa (NPR) cuya actividad se induce en presencia de nitrofenoles y disminuye *in vivo* en presencia de amonio o glutamina. En la estirpe E1F1 de *R. capsulatus* la enzima purificada hasta homogeneidad es un homodímero de 27 kDa por subunidad, que presenta actividad diaforasa y utiliza NAD(P)H como donador de electrones [4]. La reducción del DNP comparte el sistema de transferencia de electrones Rnf de la nitrogenasa y podría estar regulado mediante modificación postraduccional por el sistema DraTG [5].

Utilizando oligonucleótidos sintetizados a partir de la secuencia se un posible gen de una nitrorreductasa presente en el genoma de *R. capsulatus* se ha amplificado y clonado dicha región génica y se ha obtenido un mutante por inserción de un marcador de resistencia a kanamicina en este gen *npr*. Este mutante está afectado tanto en la degradación de DNP como en la de ácido pícrico. Mientras que en la estirpe silvestre el crecimiento aumentaba en presencia de 1 mM de ácido pícrico con respecto al control, la estirpe mutante fue incapaz de crecer a dicha concentración. Fusiones génicas *lacZ-npr* mostraron que el DNP y el ácido pícrico son inductores de la expresión del gen *npr*, siendo esta inducción del orden de tres veces superior en el caso del ácido pícrico. Cuando se cultivanron las células de *R. capsulatus* en condiciones diazotróficas, con malato como fuente de carbono y en presencia de ácido pícrico, el crecimiento aumentaba, ya que este compuesto podría actuar como sumidero electrónico, o como fuente adicional de nitrógeno y/o carbono. A concentraciones de ácido pícrico superiores a 0,2 mM se observó excreción de nitrito al medio. Por otro lado, el crecimiento fue dependiente de la concentración de ácido pícrico, especialmente en condiciones diazotróficas.

[1] Blasco R, Moore E, Wray V, Pieper D, Timmis K y Castillo F. 1999. J Bacterial. 181: 149-152.
[2] Lenke H y Knackmuss HJ. 1996. Appl. Environ. Microbiol. 62: 784-790.
[3] Blasco R y Castillo F. 1992. Appl. Environ. Micribiol. 58: 690-695.
[4] Blasco R y Castillo F. 1993. Appl. Environ. Micribiol. 59: 1774-1778.
[5] Sáez LP, García P, Martínez-Luque M, Klipp W, Blasco R y Castillo F. 2001. J Bacterial. 183:1780-1783.

SV-15

Incremento en la supervivencia de *Pseudomonas putida* KT2440.

Muñoz-Rojas, J.* y Ramos, J. L.

Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, 18008 Granada.
**jmrojas@eez.csic.es*

Pseudomonads son bacterias ubicuas que pertenecen a la subclase gamma de las proteobacterias. Estas bacterias son capaces de estimular el crecimiento de plantas, degradar contaminantes biogénicos y xenobióticos, inhibir el crecimiento de patógenos y sintetizar compuestos novedosos. Por esta razón se considera que estas bacterias poseen un considerable potencial que podría ser usado para fines agronómicos y biotecnológicos, particularmente en áreas de bioremediación, como agentes de control biológico para la protección de plantas y para la producción de nuevos bioplásticos. *P. pútida* KT 2440 es la Pseudomonads saprofita mejor caracterizada, es una bacteria libre de plásmidos y fue la primera bacteria Gram negativa del suelo en ser certificada como cepa biosegura para la clonación de genes foráneos. El genoma completo y el análisis de la secuencia de esta bacteria han sido recientemente terminados, revelándose diversos sistemas de transporte y metabólicos. El análisis del genoma corrobora la naturaleza no patogénica de *P. putida* y ha mostrado nuevas aplicaciones en agricultura, biocatálisis, bioremediación y producción de bioplásticos.

Cuando uno tiene una bacteria con todas estas propiedades es deseable elaborar un inoculante bacteriano para explotar sus beneficios. No obstante, muchas bacterias no son capaces de mantenerse viables, en los distintos acarreadores de un inoculante, el tiempo suficiente; desde que son producidas hasta su uso. Un factor importante que afecta a la supervivencia de las bacterias en un inoculante es el estrés generado por la pérdida de agua. En particular, *P. putida* KT2440 es muy sensible a los procesos de desecación, por lo que es necesario conocer como podemos aumentar su supervivencia a estas condiciones. Algunos genes involucrados en la osmotolerancia y desecación han sido identificados y aislados de plantas, bacterias y otros organismos. En el presente trabajo se han introducido algunos de estos genes a *P. putida* y se ha estudiado su efecto en la tolerancia a estrés por NaCl, así como el efecto en el aumento de la supervivencia de la bacteria en condiciones de desecación. El efecto de estos genes podría se utilizado para aumentar la supervivencia de otras bacterias de interés agronómico como son las fijadoras de nitrógeno y las promotoras del crecimiento de plantas (PGPR).

Sesión VI.

Nuevos Confines
de la Fijación Biológica de Nitrógeno

SVI-P1

Fijación de N_2 en la Antártida.

Fernández Valiente, E.[1]*, Quesada, A.[1], Rico, E.[2], y Camacho, A.[3]

[1]Departamento de Biología, [2]Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, 28049-Madrid.
[3]Departamento de Microbiología y Ecología. Universidad de Valencia, 46010-Valencia
**eduardo.fernandez@uam.es*

La fijación biológica del N_2 juega un papel destacado en muchas zonas polares terrestres y de agua dulce, ya que supone una entrada importante de nitrógeno a estos ecosistemas, que normalmente se encuentran limitados en nitrógeno. La mayor parte de la fijación de N_2 en estas latitudes extremas se debe a la presencia de cianobacterias fijadoras de N_2 [(3)]. Estos microorganismos pueden encontrarse en forma de colonias aisladas o asociadas a otros organismos como musgos, líquenes y, en el caso de las islas subantárticas, angiospermas. Pero en su mayor parte, se encuentran en comunidades microbianas en las que son los organismos dominantes.

La presencia más abundante de cianobacterias en las regiones polares tiene lugar en el fondo de lagos, lagunas, charcas y arroyos, donde las cianobacterias forman tapetes microbianos bentónicos que pueden llegar a alcanzar varios centímetros de grosor. Estos tapetes microbianos consisten típicamente en una matriz de cianobacterias filamentosas, especialmente oscilatoriaceas, junto con materiales inorgánicos y otros organismos como bacterias, protozoos, diatomeas, tardígrados, nemátodos y rotíferos[(2)]. En estas comunidades son también abundantes, aunque rara vez dominantes, las cianobacterias con heterocistos, fundamentalmente de los géneros *Nostoc, Anabaena, Nodularia y Calothrix*.

Los tapetes microbianos se desarrollan en la Antártida continental en los llamados "oasis antárticos", situados en las zonas costeras y donde durante el verano austral buena parte de los lagos, lagunas y arroyos están libres de hielo permitiendo el desarrollo de una intensa actividad biológica. Una de las zonas en las que las cianobacterias alcanzan un mayor desarrollo es la conocida como McMurdo Ice Shelf (78ºS, 166ºE). Un área de 1500 km² que contiene una gran cantidad de lagunas y charcas de características fisico-químicas muy diferentes. En todos los tapetes investigados se encontró actividad fijadora de N_2, con valores que oscilaban entre 6 y 201 µmol etileno.m^{-2}.h^{-1} [(1)]. Valores similares de fijación de N_2 se han encontrado en los tapetes microbianos de las islas Livingston (62º38'S, 60º30'W) y Decepción (62º58'S, 60º 41'W).

[1]Fernández Valiente, E., Quesada, A., Howard-Williams,C. y Hawes, I. (2001) N_2-fixation in cyanobacterial mats from ponds on the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Microbial. Ecol.* 42:338-349.
[2]De los Ríos, A., Ascaso, C., Wierzchos, J., Fernández Valiente, E. y Quesada A. (2004) Microstructural characterization of cyanobacterial mats from the McMurdo Ice Shelf, Antarctica. *Appl. Environ.Microbiol.* 70:569-580.
[3]Vincent, W.F. (2000) Cyanobacterial dominance in the polar regions. En: Whitton BA y Potts M (eds) *The Ecology of Cyanobacteria*. Kluwer Academic Press Dordrecht, pp 321-340.

SVI-P2.

El regulón *nif* en un aislado ambiental de la bacteria acidófila *Leptospirillum ferrooxidans*: conexión con otras funciones metabólicas.

Parro, V.* , y Moreno Paz, M.

Centro de Astrobiología (CSIC-INTA). Carretera de Ajalvir km4, Torrejón de Ardoz, Madrid.
**parrogv@inta.es*

Leptospirillum ferrooxidans es una bacteria Gram-negativa quimiolitoautótrofa, oxidadora estricta de Fe^{2+}, uno de los microorganismos más abundantes de ambientes ácidos (pH entre 1.2 y 2.4, y altas concentraciones de metales (hasta 40 g/l de Fe^{3+}), y uno de los responsables directos del mantenimiento del pH bajo y por tanto de las propiedades físico-químicas del ecosistema donde se encuentra. La capacidad de bio-oxidar y solubilizar metales a partir de minerales han dado a *L. ferrooxidans* un papel cada vez más importante en la industria de la biominería [1], además de considerarse como el responsable principal del drenaje ácido de las minas, de gran impacto medio-ambiental. Asimismo, es de interés especial para el estudio del origen de la vida puesto que se trata de una bacteria con requerimientos nutricionales tan mínimos como la presencia de hierro reducido (Fe^{2+}), CO_2 y N_2 como fuentes de energía, carbono y nitrógeno respectivamente. Sin embargo muy poco se sabe de su biología molecular.

Uno de los aspectos que no estaba bien estudiado era su capacidad fijadora de nitrógeno. Se sabía que una estirpe de *L. ferrooxidans* era capaz de oxidar Fe2+ en un medio libre de amonio y en concentraciones bajas de oxígeno. Además, en experimentos de hibridación en Southern se detectaron posibles genes *nifH* y *nifD* [2]. Desde entonces no se había hecho nada más. Hemos construido microarrays de ADN con todos los fragmentos (4.500) de una librería genómica de un asislado ambiental de *L. ferrooxidans* [3] y se han utilizado para estudiar su capacidad diazotrófica. En experimentos de expresión génica diferencial entre cultivos incubados en presencia o ausencia de amonio como fuente de nitrógeno, hemos secuenciado e identificado la gran mayoría de genes y operones implicados en fijación de nitrógeno, a parte de otros nuevos de función desconocida y que pudieran estar implicados directa o indirectamente en el proceso [4]. Entre los genes identificados están: los operones *nifHDKENX* y *nifSU-hesB-hscBA-fdx*; los transportadores de Mo (*modA*) y amonio (*amtB*); *glnB*, que codifica la proteína PII, reguladora de asimilación de nitrógeno; varios sistemas de dos componentes; un operón para una Fe-hidrogenasa (similar a *hydCBA* de *Thermotoga maritima*); genes del metabolismo del azufre; genes de utilización de compuestos xenobióticos; genes de síntesis de polisacáridos, etc. Todo ello nos ha permitido elaborar un esquema de interconexión entre los diferentes aspectos metabólicos.

[1]Rawlings DE. (2002) *Annu Rev Microbiol.* 56:65-91
[2]Norris, P. R., Murrell, J. C. & Hinson, D. (1995). *Arch. Microbiol.* 164, 294–300.
[3]Gonzalez-Toril E, Llobet-Brossa E, Casamayor EO, Amann R, Amils R. (2003). *Appl Environ Microbiol.* 69:4853-65.
[4]Parro, V., and Moreno-Paz, M. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:7883-8.

Índice de Autores.

1. Abril, A., 30
2. Aburto, J., 125
3. Aguilar, M., 97
4. Aguirre de Cárcer, D., 126
5. Albareda, M. (2), 81, 124
6. Álvarez, E. R., 29
7. Aranjuelo, I., 129
8. Argandoña, M., 39
9. Armario, P. (2), 122, 123
10. Arrese-Igor, C. (2), 98, 99
11. Azcón-Aguilar, C., 69
12. Baginsky, C., 51
13. Barbera, A. C., 130
14. Barea, J. M., 69
15. Barrientos-Durán, A., 64
16. Barriuso, J., 38
17. Becana, M. (4), 110, 111, 112, 113
18. Becker, A. (3), 46, 62, 64
19. Bedmar, E. J. (3), 59, 89, 90
20. Bellogín, R. A. (2), 26, 80
21. Blasco, R., 132
22. Bolaños, L. (3), 63, 72, 73
23. Bonilla, I. (5), 26, 63, 72, 73, 84
24. Bonnard, N., 59
25. Brelles Mariño, G., 94
26. Brewin, N. J., 73
27. Brito, B. (2), 50, 51
28. Brocard, L., 22
29. Brom, S., 44
30. Bucciarelli, B., 112
31. Buendía-Clavería, A. (4), 84, 85, 86, 87
32. Bueno, E., 59
33. Caba, J., 39
34. Cabrera, E. (2), 50, 53
35. Calvo, C., 128
36. Camacho, A., 137
37. Camacho, M. (3), 26, 33, 76
38. Campalans, A., 22
39. Cantero, L., 54
40. Capdevila, S., 53
41. Carpena, R. O., 121
42. Carrasco, J. A. (3), 32, 122, 123
43. Castillo, F., 132
44. Castro, I.V. (3) 118, 119, 120
45. Caviedes, M. A. (2), 66, 122
46. Cervantes, E., 31
47. Chamber, M. (3), 32, 122, 123
48. Clemente, M. R. (2), 110, 112
49. Coba de la Peña, T., 109
50. Complainville, A., 22
51. Crespi, M. (3), 22, 56, 57
52. Cubo, T., 80
53. d'Erfurth, I., 22
54. Dardanelli, M. S. (6), 76, 77, 78, 79, 80, 81
55. Dary, M., 66
56. de Felipe, M. R. (4), 104, 105, 106,108
57. de la Cruz, F., 45
58. de Lorenzo, L. (2), 56, 57
59. de María, N., 106
60. del Bel, K. L., 58
61. del Cueto, A., 125
62. del Moral, A., 39
63. Delgado, M. J. (2), 59, 90
64. Denia, E. (2), 98, 99
65. Doménech Manteca, J., 74
66. Domínguez-Ferreras, A. (3), 46, 47, 131
67. Donate Correa, J. (2), 82, 83
68. Dowling, D., 126
69. Downie, A. J., 88
70. El Mounadi, K., 66
71. Erice, G., 129
72. Espuny, M. R., 80
73. Esteban, E., 121
74. Estévez, J. (3), 77, 78, 79
75. Fedorova, E. E. (3), 104, 105, 109
76. Fernández, F., 78
77. Fernández Valiente, E. (2), 125, 137
78. Fernández-Carazo, R., 39
79. Fernández-Pascual, M. (2), 106, 121
80. Ferreira, E. (2), 118, 120
81. Ferrol, N., 69
82. Fiscella, T., 130
83. Frendo, P., 108
84. Frugier, F., 57
85. Gálvez, L. (2), 98, 99
86. Gamane, D., 76
87. Gantois, I., 28
88. García Garrido, J. M., 71
89. García-Fraile, P., 34
90. García-Luque, I., 106
91. García-Trigueros, C., 77
92. Garcia-Villaraco, A., 38
93. Gil-Serrano, A. (2), 75, 78
94. Gómez-Villalba, B., 128
95. Gomis, V., 28
96. González, E. M. (2), 98, 99
97. González-López, J. (2), 60, 128
98. González-Sama, A., 106
99. Guevara, M. A., 106
100. Gutierrez Mañero, F. J., 74
101. Gutierrez, R. (4), 84, 85, 86, 87

102. Hernández, I., 21
103. Herrera Medina, M. J., 71
104. Herrera-Cervera, J. A. (7), 44, 45, 65, 100, 101, 103, 131
105. Hidalgo, A. (5), 26, 84, 85, 86, 87
106. Hynes, M.F., 58
107. Igual, J. M. (2), 27, 31
108. Imperial, J. (7), 43, 50, 51, 52, 53, 54, 127
109. Iribarne, C. (4), 93, 101, 102, 103
110. Irigoyen, J.J., 129
111. James, E.K., 112
112. Jiménez, R., 32
113. Jiménez-Zurdo, J.I., 91
114. Jofre, E., 62
115. Karlson, U., 126
116. Kevei, Z., 22
117. Kondorosi A., 22
118. Kondorosi, E. (2), 22, 63
119. Koshiba, T., 104
120. Ladrera, R., 98
121. Lei, W., 87
122. Leidi, E.O., 33
123. Lemos, A., 36
124. León Barrios, M. (3), 28, 82, 83
125. Llamas, I., 39
126. Lloret, J. (2), 61, 62
127. Lloret, L., 21
128. Lluch, C. (8), 65, 93, 100, 101, 102, 103, 130, 131
129. Logan, N.A., 37
130. López Baena, F. J. (3), 79, 80, 81
131. López, M. (3), 65, 101, 103
132. Lorite, M. J., 89
133. Loscos, J., 110
134. Lucas, M. M. (6), 45, 104, 105, 107, 108, 109
135. Lucas García, J.A., 38
136. Lucena, J. J. (2), 26, 84
137. Ludeña, D., 32
138. Mackova, M., 126
139. Manyani, H., 52
140. Marco, D., 40
141. Marino, D. (2), 98, 99
142. Martín, D., 125
143. Martín, M. (2), 70, 126
144. Martínez, J., 21
145. Martínez, L., 21
146. Martínez, M., 53
147. Martínez-Abarca, F., 64
148. Martínez-Checa, F., 39
149. Martínez-Molina, E. (7), 25, 28, 29, 32, 34, 35, 91
150. Martínez-Romero, E., 21
151. Marugán, V., 54
152. Matamoros, M.A. (2), 92, 110
153. Mateos, P.F. (7), 25, 28, 29, 32, 34, 35, 91
154. Maunoury, N. (2), 22, 63
155. Megias, M. (10), 56, 57, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81
156. Meloni, S., 55
157. Merchán, F. (2), 56, 57
158. Mergaert, P. (2), 22, 63
159. Molina-Sánchez, M. D., 64
160. Molinero, N. (2), 59, 90
161. Mora, L., 60
162. Mora, M., 62
163. Morales Vela, G., 71
164. Morán, J.F., 98
165. Moreno Paz, M., 138
166. Moreno Vivián, C., 132
167. Morón, B. (2), 75, 78
168. Muñoz de la Pascua, L., 32
169. Muñoz, S. (3), 44, 45, 127
170. Muñoz Rojas, J, 133
171. Navascués Ortega, B., 89
172. Naya, L. (2), 110, 111
173. Nikovics, K., 22
174. Nogales, J.
175. Noreen, S. (2), 26, 75
176. Nuñez, F. J., 125
177. Ocampo Bote, J. A., 71
178. Ocaña, A. (3), 100, 101, 102
179. Ojeda, J., 79
180. Oliva-García, J. J., 48
181. Olivares, J. (7), 44, 45, 46, 47, 48, 49, 131
182. Olivera, M. (3), 93, 100, 102
183. Ollero, F. J. (3), 77, 79, 87
184. Ormeño, E., 21
185. Oruezabal, R. I., 62
186. Pajuelo, E. (2), 122, 123
187. Palacios, J. M. (5), 50, 51, 54, 55, 127
188. Palomares, A. J. (3), 66, 122, 123
189. Pando, V., 44
190. Parada, M. (4), 84, 85, 86, 87
191. Parniske, M., 92
192. Parro, V., 138
193. Peix, A., 30
194. Pereyra de la Iglesia, M. T., 74
195. Pérez-Arnedo, R. (2), 46, 47
196. Pérez Galdona, R. (2), 82, 83
197. Pérez-Hormaeche, J., 66

198. Pérez-Mendoza, D. (2), 44, 45
199. Pérez-Reinado, E., 132
200. Pérez-Rontomé, C., 110
201. Piedras, P., 97
202. Pineda, M., 97
203. Pitzschke, A., 92
204. Probanza, A., 38
205. Pueyo, J.J. (4), 104, 105, 107, 109
206. Pulido, L., 72
207. Quesada, A. (2), 125, 137
208. Quesada, E., 39
209. Ramírez-Bahena, M.H. (2), 36, 91
210. Ramos Solano, B., 74
211. Ramos, J. (2), 110, 111
212. Ramos, J.L., 133
213. Ratet, P. (2), 22, 66
214. Redondo, F.J. (2), 104, 107
215. Redondo-Nieto, M. (3), 63, 72, 73
216. Rey, L. (2), 52, 55
217. Rico, E., 137
218. Rivas, R. (8), 25, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35
219. Rivas-Boyero, A. A., 29
220. Rivilla, R. (5), 61, 62, 70, 73, 126
221. Robles, E. F., 59
222. Rodelas, B. (4), 37, 60, 88, 128
223. Rodríguez-Barrueco, C. (2), 27, 31
224. Rodríguez-Díaz, M., 37
225. Rodríguez-Llorente, I. D., 66
226. Rodríguez-Navarro, D. N. (5), 33, 75, 81, 84, 117
227. Rogel, M. A., 21
228. Roldán, M.D., 132
229. Romero, D., 44
230. Rosenblueth, M., 21
231. Rüberg, S., 64
232. Rubio, M. C. (2), 112, 113
233. Ruiz-Argüeso, T. (7), 50, 51, 52, 53, 54, 55, 127
234. Ruiz-Sainz, J.E. (4), 26, 85, 86, 87
235. Sánchez Raya, J., 89
236. Sánchez-Contreras, M. (2), 88, 126
237. Sánchez-Díaz M. , 129
238. Sanjuán, J. (10), 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 127, 131
239. Santa Regina, I. (2), 27, 31
240. Scharf, B., 49
241. Schlaman, H., 26
242. Schmitt, R. , 49
243. Sepúlveda, E., 44
244. Serra, M.T., 106
245. Silva, C., 21
246. Soria-Díaz, M. E. (2), 75, 78
247. Soto, M. J. (5), 46, 47, 48, 49, 131
248. Sousa, C. (7), 56, 57, 75, 76, 77, 78, 79
249. Soussi, M., 108
250. Spaink, H. P., 113
251. Talbi, C., 90
252. Tamayo Navarrete, M. I., 71
253. Tarayre, S., 22
254. Tejera, N. A. (6), 65, 93, 100, 102, 103, 131
255. Temprano, F. J. (2), 84, 124
256. Thomas-Oates, J. (3), 26, 75, 78
257. Toledo, I., 21
258. Toro, N., 64
259. Torres, C., 21
260. Tresierra-Ayala, A., 90
261. Trinh, H., 22
262. Trujillo, M. (5), 25, 27, 28, 32, 91
263. Ureta, A. C., 127
264. Valverde, A. (2), 27, 31
265. van Dillewijn, P., 48
266. Vance, C.P., 112
267. Vaubert, D., 22
268. Vázquez, S., 121
269. Velázquez, E. (11), 22, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 91
270. Verroios, G., 75
271. Vílchez, R., 89
272. Villacieros, M., 126
273. Vinardell, J. M. (5), 22, 84, 85, 86, 87
274. Vinuesa, P., 21
275. Vizcaíno, N., 32
276. Walker, G. C., 61
277. Wang, E.T., 36
278. Willems, A. (2), 30. 32
279. Yang, S. S. (2), 26, 84
280. Yost, C. K., 58
281. Zacchi, L., 122
282. Zhou, J. C. (2), 26, 84
283. Zornoza, P., 121
284. Zurdo-Piñeiro, J. L. (2), 32, 91

Índice de Asistentes.

1. Albareda Contreras, Marta
2. Alvárez Martínez, Estela R.
3. Aparicio Tejo, Pedro
4. Aranjuelo Michelena, Iker
5. Arrese Igor, César
6. Baguinsky, Cecilia
7. Barbera, Antonio C.
8. Barrientos, Antonio
9. Becana Ausejo, Manuel
10. Bedmar Gómez, Eulogio
11. Bolaños Rosa, Luis
12. Bonilla Mangas, Ildefonso
13. Brelles Mariño, Graciela
14. Brito López, Belén
15. Buendía Clavería, Ana
16. Bueno Romero, Emilio
17. Cabrera Ordóñez. Ezequiel
18. Camacho Martinez-Vara de Rey, Maria
19. Cantero González, Laura
20. Castillo, Francisco
21. Clemente Gallardo, Mª Rebeca
22. Coba de la Peña, Teodoro E.
23. Dardanelli, Marta S.
24. De Felipe Antón, Mª Rosario
25. De Lorenzo Barrios, Laura
26. De María de las Heras, Nuria
27. Del Cueto Ginzo, Ana Isabel
28. Del Moral García, Ana
29. Delgado Igeño, Mª Jesús
30. Domínguez Ferreras, Ana
31. Donate Correa, Javier
32. Espuny Gómez, Mª Rosario
33. Estévez Amador, Jana
34. Fernández Pascual, Mercedes
35. Fernández Valiente, Eduardo
36. Ferrol González, Nuria
37. Gamane, Djamila
38. García Fraile, Paula
39. García Garrido, José Manuel
40. Gil Serrano, Antonio Miguel
41. Gómez-Villalba Pelayo, Beatriz
42. González López, Jesús
43. Gutiérrez Mañero, Francisco J
44. Gutiérrez Santigosa, Cristina
45. Herrera Cervera, Jose A.
46. Hidalgo, Angeles
47. Hynes, Michael F.
48. Igual Arroyo, José M.
49. Imperial Ródenas, Juan
50. Iribarne, Carmen
51. Irigoyen Iparrea, Juan J.
52. Jiménez Zurdo, José I.
53. Kondorosi, Adam
54. León Barrios, Milagros
55. López Gómez, Miguel
56. Loscos Aranda, Jorge
57. Lucas, Mª Mercedes
58. Lloret Romero, Javier
59. Lluch Plá, Carmen
60. Manyani, Hamid
61. Marco García, Diana E.
62. Martínez Molina, Eustoquio
63. Martínez, Esperanza
64. Martínez Toledo, Mª Victoria
65. Matamoros, Manuel
66. Mateos González, Pedro F.
67. Megías Guijo, Manuel
68. Mendes Ferreira, Eugenio
69. Merchán Ignacio, Francisco
70. Molina Sánchez, Mª Dolores
71. Mora de Zayas, Laura
72. Morón Flores, Belén
73. Muñoz Rodríguez, Mª Socorro
74. Muñoz Rojas, Jesús
75. Navascués Ortega, Beatriz
76. Ocaña Cabrera, Antonio
77. Oliva García, Juan J.
78. Olivares Pascual, José
79. Oruezabal Guijarro, Roke
80. Pajuelo Domínguez, Eloísa
81. Palacios Alberti, José Manuel
82. Palomares Díaz, Antonio J.
83. Parada Ibáñez, Maribel
84. Parro, Víctor
85. Peix Geldart, Álvaro
86. Pérez Arnedo, Rebeca
87. Pérez Galdona, Ricardo
88. Pérez Mendoza, Daniel
89. Pérez Rontomé, Mª Carmen
90. Pineda, Manuel
91. Pozo Llorente, Clementina
92. Probanza Lobo, Agustín
93. Pueyo Dabab, Jose J.
94. Ramírez Bahena, Martha H.
95. Ramos Escribano, Javier
96. Ramos Solano, Beatriz
97. Redondo Nieto, Miguel
98. Redondo Vela, Francisco J.
99. Rey Navarro, Luis
100. Rivas González, Raúl
101. Rivilla Palma, Rafael
102. Robles Cortés, Eloy
103. Rodelas González, Mª Belén
104. Rodríguez Díaz, Marina
105. Rodríguez Navarro, Dulce N.
106. Rodríguez-Llorente, Ignacio D.
107. Rubio Luna, Mª Carmen
108. Ruiz Argüeso, Tomás
109. Ruiz Sainz, Jose E.
110. Sánchez Contreras, María
111. Sánchez Díaz, Manuel

112. Sanjuán Pinilla, Juan
113. Soto Misffut, Mª José
114. Sousa Martín, Carolina
115. Soussi Erakouni, Mariam
116. Talbi, Choura
117. Tejera García, Noel A.
118. Temprano Vera, Francisco J.
119. Toro García, Nicolás
120. Ureta Barrios, Ana Claudia
121. Valverde Portal, Ángel
122. Velázquez Pérez, Encarna
123. Videira e Castro, Isabel
124. Vílchez Vargas, Ramiro
125. Vinardell, Jose M.
126. Zornoza, Pilar

Organizan:

Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN)
Universidad de Granada,
Departamento de Microbiología y Departamento de Fisiología Vegetal
Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC),
Estación Experimental del Zaidín

Entidades colaboradoras:

Fundación Euroárabe · Ayuntamiento de Granada · Caja Rural · VWR International
Junta de Andalucía · Hucoa Erlöss · Roche · Jesús Rubio Acuarelas · Caja Granada ·

ISBN: 84-688-6707-1
Depósito Legal: GR-746/2004