

Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud.

“Entremos más adentro en la espesura”.

San Juan de la Cruz

Excmo. Sr. Presidente de la Real Academia Nacional de Farmacia
Excmos. Sres Académicos
Queridos compañeros y amigos:

En primer lugar quiero agradecer sinceramente a los miembros de esta Academia por el honor que me hacen con la elección como Académico Correspondiente y que espero no decepcionar contribuyendo eficazmente al quehacer de esta Corporación.

Al Sr. Presidente por brindarse amablemente a hacer mi presentación, y de una manera muy especial al Excmo. Sr. Don Segundo Jiménez, inspirador de la propuesta, y a los Exmos. Srs. Alberto Giráldez y Román de Vicente.

También quiero destacar el apoyo que he recibido de mi familia para realizar mi carrera investigadora. De mis hijos, de mis padres, y de mi esposo con quién deseo compartir este honor y sin cuya ayuda no habría llegado a recibir este reconocimiento.

Recordaré siempre con gratitud al Excmo. D. César González Gómez, miembro que fue de esta Academia, que me descubrió el mundo de la investigación científica, cuando estaba terminando mi Licenciatura en Farmacia, y al Prof. William Jensen del Dpto. de Life Sciences de la Universidad de California en Berkeley, por despertar mi interés por el estudio de la célula vegetal.

Por último, quiero también mencionar muy especialmente , la ayuda de mi grupo de investigación, aquí presente, por su competencia y fidelidad que han hecho posible tantos años de colaboración y un trabajo fructífero.

Introducción

La ciencia en general, surge de un interrogarse el hombre desde sus comienzos en este planeta. Podría decirse que el científico se parece a un explorador que al recorrer montañas desconocidas tras las que aparecen siempre otras más altas y lejanas envueltas en una creciente niebla, no puede dejar de preguntarse por lo que hay más allá. Pues las grandes leyes que sigue la naturaleza son como picachos que asoman sobre nubes brumosas en una incitación apremiante a buscar lo que hay detrás. (Fernández Rañada, 2002).

Mi discurso va a versar sobre un campo de interés creciente, sobre las interacciones microorganismo-suelo-planta, que necesita ser investigado en profundidad, dada su complejidad, pues a pesar de los muchos estudios que se han realizado, nuestro conocimiento es todavía muy limitado. Los estudios que he llevado a cabo en este campo a nivel de Fisiología y Bioquímica Vegetal los he complementado siempre con técnicas histoquímicas para lograr un mejor conocimiento de estos mecanismos, mediante la interrelación estructura-función.

Así pues la aportación de mis investigaciones a las interacciones estudiadas han ido dirigidas en gran parte al conocimiento de las estructuras vegetales implicadas y a la localización de los componentes químicos “in situ”, para poder comprender mejor la función que ambos realizan en la interacción.

Las técnicas histoquímicas disponibles en la actualidad, se han desarrollado ampliamente, constituyendo un potencial muy eficaz para el estudio complementario de los mecanismos bioquímicos y moleculares de un determinado proceso, y han alcanzado un gran nivel paralelamente al desarrollo de la Genética y la Biología Molecular.

Consideraciones previas

Si miramos atentos, con mirada profunda, constatamos la perfección de la creación, pues el mundo macroscópico que vemos está formado por microunidades microscópicas integradoras de los seres vivos, relacionadas entre sí y entrelazadas siguiendo una perfecta armonía, lo que nos lleva a pensar a menudo, en la creación de un planeta armónico, capaz de autodefenderse y autorregularse por sí mismo, siguiendo las leyes de la Naturaleza en cada uno de sus componentes.

La humanidad desde hace siglos, y por voluntad del Creador, tiene colgada su existencia del misterioso hilo de sucesos que se producen cuando las semillas se alojan en el generoso seno del suelo, que convierte en realidad el misterio, en potencia, del equipo hereditario. El suelo es un arca mágica, un sistema complejo, que alberga entre otros componentes, el misterio de las membranas radiculares, capaces de unir el mundo vivo y el mundo muerto.

Si consideramos la diversidad de fenómenos inorgánicos y orgánicos que se producen en el suelo y las variaciones de todos los órdenes a que está sujeto, podríamos decir que el suelo es la capa viviente de transformación de la esfera sólida terrestre, surgida bajo el influjo de la vida y de las especiales condiciones ambientales de un habitat biológico, que esta sometido a un constante cambio y desarrollo peculiar (Kubierna, 1944). Puesto que el suelo surge bajo la influencia del desarrollo de la vida, es necesario tener ésta muy en cuenta, pues el proceso de desarrollo corre paralelo generalmente al proceso de colonización del suelo por los organismos (microorganismos, vegetación, animales y el hombre). Pero son muchos los factores que intervienen en su formación y desarrollo, y por ello en cada caso el suelo es una individualidad, un conjunto resultante de acciones variadisimas, entre las que las condiciones ambientales juegan un papel clave. Si la vida ejerce (directa o indirectamente) tan gran influjo sobre el suelo, éste delimita las condiciones de vida. De ahí la estrecha relación entre las Ciencias del Suelo, y la Agricultura, y existen métodos de estudio del suelo análogos a los biológicos, como es por ejemplo la micromorfología del suelo, introducida en España por el Profesor Kubierna, que estudia el suelo *in situ* en preparaciones de cortes delgados para conocer sus componentes, de un modo similar a los métodos histológicos que informan de la composición anatómica de un tejido.

El Profesor Albareda tuvo una visión muy amplia cuando creó nuestro Instituto en 1942, relacionando las Ciencias del Suelo con la Fisiología Vegetal y la Ecología. La filosofía de su creación se fundamentó en que planta y suelo constituyen una unidad, con las más extensas interacciones, de las que brotaran conocimientos de ciencia natural pura y aplicaciones agrícolas y forestales.

El suelo, agente de vida

Rocas y sedimentos geológicos han sufrido alteraciones durante la formación del suelo por factores geológicos, topográficos, climáticos, físicos, químicos y biológicos, para formar una entidad viviente, compuesta de una asociación de partículas inorgánicas o minerales, entrelazadas con materia orgánica y gases difundidos. Cuando el suelo es humedecido con agua, este complejo sistema se transforma en un sustrato fértil, donde brota la vida en el planeta. Esta es la zona de la pedosfera, que sostiene la vida sobre la tierra y que es biológicamente un medio activo y estructurado, al servicio de su verdadera función, como es su aprovechamiento para el desarrollo de los seres vivos.

En su estado natural, el suelo constituye una entidad biológica, regulada por sí misma, que evoluciona lentamente en el tiempo. Podría compararse a una esponja, regulando y amortiguando el suministro de nutrientes y agua para el crecimiento de la macro y microflora, y de la fauna, y determinando el reparto del agua, entre la que fluye por la superficie hacia los ríos y lagos y la que percola para reponer los acuíferos y reservorios de aguas subterráneas.

Pero el suelo no solamente sirve para promover y sostener la vida en sus formas variadas, sino que también actúa como un filtro viviente de los restos generados por hombres y animales. En este papel, limpia, purifica, recicla y disminuye el daño de muchas toxinas y patógenos que de otro modo irreparablemente contaminarían y degradarían el ambiente. Algunos de sus componentes, los microorganismos, producen antídotos, que controlan las infecciones y enfermedades de las raíces. La manipulación del hombre puede romper esta autorregulación y puede conducir a situaciones difíciles para la vida, ya que el suelo es un recurso no renovable que hay que mantener y proteger.

Los organismos juegan un papel fundamental en la estructura del suelo, crecimiento de las plantas y ciclos del carbono y del nitrógeno. El suelo es de entre todos los ecosistemas terrestres el que presenta una mayor riqueza en especies. En él conviven una gran cantidad de microorganismos, como bacterias, hongos, protozoos y algas. Pero de todos los grupos anteriormente ennumerados, el más abundante y diverso es el constituido por bacterias, posiblemente por ser capaces de crecer más rápidamente y poder utilizar una gran variedad de compuestos como fuentes de carbono y de nitrógeno. Las bacterias se localizan en la superficie de las partículas del suelo, pudiendo interactuar con las raíces de las plantas, ya que hay una alta concentración

de nutrientes en esa zona. Las bacterias además poseen, quizá más que otros organismos, una gran adaptabilidad, tanto fisiológica como genética (transferencias horizontales y verticales), elevada tasa de mutación, variación de fase, etc., frente a la variación de las condiciones del suelo. Por el contrario, muchos microorganismos exógenos que se introducen en el suelo, pueden no tener la capacidad de adaptarse a ese ambiente, y no llegan a sobrevivir en él, de ahí que no prosperen ciertas inoculaciones con bacterias, usadas en prácticas biotecnológicas, de probada eficacia bajo condiciones controladas.

Los avances en biología molecular que han hecho posible el estudio de organismos que crecen en el laboratorio en los medios de crecimiento utilizados, deberían hacer posible el crecimiento de las poblaciones del suelo en estos medios para poder identificarlos y tener un mayor conocimiento de sus propiedades, y poder manipularlos en nuestro beneficio. Se calcula que existen en el suelo unas 30.000 especies de bacterias y 1.500 especies de hongos, de los cuales sólo han sido identificados un 8% y un 1% respectivamente.

De todos ellos, los microorganismos que crecen alrededor de las plantas, constituyen la biomasa mayor de nuestro planeta. Las bacterias son sin duda alguna el grupo de organismos metabólicamente más significativos de los organismos del suelo. Su clasificación taxonómica se actualiza en el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1995). En cuanto a los hongos, son los organismos del suelo más dominantes, por los múltiples procesos que realizan y por su gran biomasa.

En algunos suelos la biomasa de los hongos excede la formada por todos los demás organismos combinados, siendo su papel la descomposición y mineralización de compuestos de origen vegetal y animal (celulosa, hemicelulosa, lignina y quitina) y también su implicación en simbiosis beneficiosas con raíces de plantas, a las que capacitan para vivir en condiciones limitantes de nutrientes o de agua e incluso aumentan su resistencia a patógenos, los cuales causan billones de euros en pérdidas de los cultivos.

La Rizosfera

La vida de las plantas está condicionada por la existencia de esta amplia gama de microorganismos que viven asociados con ellas, los cuales pueden alterar la absorción de nutrientes, por efecto directo sobre las raíces, por efecto sobre el medio, y por competir directamente por los nutrientes del suelo. Estos microorganismos actuando principalmente desde la rizosfera, condicionan la nutrición y la salud de las plantas y por tanto el correcto funcionamiento de toda la biosfera. Se considera a la rizosfera como una zona de intensa actividad microbiana alrededor de las raíces, cuya influencia estimula el crecimiento y aumenta la densidad de microorganismos entre 10^2 a 10^3 respecto al resto del suelo. Esta zona del suelo adyacente a las raíces es dinámica y cambiante, y tiene unas características físicas, químicas y biológicas diferentes del resto del suelo. En 1904 Hiltner definió la rizosfera como aquella porción del suelo en torno a las raíces, con una mayor actividad microbiana, resultante de la alta concentración de carbono y otros nutrientes existentes en esta zona, ampliándose este concepto en la actualidad hasta considerar como rizosfera la porción de suelo influida por las raíces vivas.

El interés cada vez mayor de utilizar microorganismos para lograr el sueño de una agricultura y silvicultura sostenible donde se excluya el uso de fitosanitarios caros y nocivos, conduce a una mayor atención sobre la manipulación más efectiva de la rizosfera. Desde que Hiltner la definió, ha habido bastantes avances en reconocimiento al importante papel de los microorganismos sobre el crecimiento de las plantas. Son muchos los trabajos realizados [Rovira (1956), Rovira y Bowen (1966), Rovira y colaboradores (1979), Bowen y Rovira (1991), Bowen y Rovira (1999), Lucas y colaboradores (2000) y Molina y colaboradores (2001)], destacando sobre todos ellos los realizados por Rovira y su grupo en Australia, llegando a denominarse “efecto rizosfera” a la influencia de la planta sobre el suelo aunque a medida que los trabajos han ido progresando, podemos considerar el “efecto rizosfera” más que como un efecto, como un sistema natural con propiedades, elementos y fronteras definidas en el que se identifican tres zonas:

- a) La ectorizosfera: región del suelo en contacto directo con la raíz
- b) El rizoplano: región radical que está en contacto directo con el suelo
- c) La endorizosfera: región del tejido cortical de la planta formada de varias capas de células, la cual es colonizada por microorganismos.

El estudio de este sistema es complejo, no sólo por el alto número de interacciones que en él se dan, sino por la escala espacial y temporal de elementos y procesos. La planta durante su desarrollo va a influir en la microflora edáfica y a su vez los microorganismos van a reaccionar con las plantas, estableciendo diferencias en la fertilidad del suelo.

La mayoría del conocimiento sobre la existencia física de la rizosfera se deriva de la microscopía electrónica de transmisión y barrido (Foster, 1986; Foster y col., 1983). Estos estudios han mostrado que las células epidérmicas de las raíces están recubiertas de polisacáridos de doble origen, vegetal y microbiano, de grosor variado, en el cual las colonias de microorganismos están incluidas y asentadas. Entre ellos los azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, etc., son responsables de las especies, variedades y número de microorganismos en la rizosfera. Un componente puede estimular el crecimiento de un microorganismo y puede ser neutral o inhibidor para otros. Así, los compuestos flavonoides exudados por las raíces de leguminosas, si se añaden al medio estimulan el crecimiento del *Bradyrhizobium japonicum*, pero disminuyen un 20% el crecimiento de *Pseudomonas*. Los sideróforos exudados por gramíneas del mismo modo a los excretados por ciertas bacterias, pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos, llegando a reducir la disponibilidad del hierro a otros y por tanto a su inhibición.

Las condiciones ambientales de crecimiento de la planta influyen decisivamente sobre estos exudados en cantidad y composición. Además las raíces cambian física y fisiológicamente con la edad y el medio que las rodea, por lo que las sustancias excretadas son diferentes, siendo la producción de aminoácidos, siempre mayor cerca de la cofia, zona muy metabólica y de mayor absorción de agua y nutrientes.

El mucilago que rodea la cofia de las raíces y se extiende a lo largo de los primeros centímetros de la raíz (Jenny y Grossenbacher, 1963) juega un importante papel en el dinamismo de esta zona. Durante mi periodo de estancia en la Universidad de California (1964), colaboré con los profesores Jenny y McLaren en el esclarecimiento del origen de la capa mucilaginosa de las raíces, ya que en dicha Universidad había dos teorías. Los partidarios de que su formación se debía exclusivamente a los exudados de las raíces (Dptº de Suelos y Nutrición Vegetal) y los que opinaban que su origen era exclusivamente microbiano (Dptº de Microbiología). Utilizando plantas estériles y no estériles y analizando la rizosfera por microscopía óptica y

electrónica concluimos que la capa mucilaginosa es producto de la planta y de las excrecciones de microorganismos que viven sobre ella.

A pesar de muchos años de aislamiento de microorganismos de la rizosfera, nuestro conocimiento real es fragmentario. Los métodos tradicionales de cultivo “in vitro” recobran solamente un pequeño porcentaje de los organismos reconocidos previamente por el microscopio y los contados directamente. La temperatura de incubación y la riqueza del medio juegan un papel importante para el organismo aislado y especialmente la composición del medio de cultivo tiene un papel primordial. Así las *Pseudomonas* fluorescentes han sido calificadas como el mayor grupo bacteriano de la rizosfera, lo que obedece únicamente a que dado el interés de éstas bacterias para su uso como protectores de plantas, se han buscado medios selectivos para su aislamiento (Kloepper y col. 1992).

Pero si se conocieran las características específicas que controlan el crecimiento y supervivencia de las especies, sería posible modificarlas para favorecer el crecimiento de los microorganismos deseables y eliminar a los indeseables. El interés de la manipulación se basa también en que las raíces colonizadas pueden ser un vector eficaz de introducción de bacterias con características adecuadas para procesos de Bioremediación (Brazil y col. 1995).

La introducción de un organismo foráneo en el suelo, muy beneficioso en condiciones axénicas, puede tener problemas en condiciones naturales, no entrando a formar parte de la microflora del suelo. La literatura está repleta de fallos, p.e. cuando se ha intentado introducir cepas de *Rhizobium* no autóctonas para aumentar la fijación de nitrógeno en leguminosas, así como también de ciertos éxitos, en el caso de inoculación de microorganismos para el control de enfermedades de plantas. Sin embargo, el conocimiento limitado de la rizosfera es una de las razones de la falta de éxito en la posible modificación de la misma.

Tipos de organismos del suelo.

Los microorganismos del suelo pueden ser separados en beneficiosos o perjudiciales e infectivos y no infectivos. Los organismos beneficiosos infectivos incluyen los fijadores de nitrógeno, bacterias Gram negativas, tales como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*,

Mesorhizobium, que viven en simbiosis con leguminosas. El actinomiceto *Frankia* que fija nitrógeno en determinados árboles y arbustos, tales como *Alnus*, *Myrica*, *Eleagnus*, *Casuarina*, etc., los hongos ectomicorrizicos que establecen simbiosis con un gran número de árboles, y las micorrizas arbusculares (AM), que se asocian a las raíces de la mayoría de las plantas superiores excepto con las *Brassicaceas* y *Quenopodiaceas*.

Otros fijadores de nitrógeno en asociación no simbiótica, han demostrado gran capacidad para sustituir a los fertilizantes nitrogenados y contribuir a la sostenibilidad de los sistemas agrícolas, siendo pioneros algunos países como Brasil, en cultivos de caña de azúcar y maíz, caracterizándose Brasil por ser uno de los países menos contaminados por fertilizantes sintéticos. Los organismos responsables de este tipo de fijación se encuentran en estado libre en el suelo, obteniendo la energía requerida para la fijación de nitrógeno de la fotosíntesis o de la oxidación de productos orgánicos del suelo.

Entre los organismos fotosintéticos, se encuentran eubacterias fototrófas como *Rhodobacter* y algunas cianofíceas, algas verdes azuladas: *Azolla*, *Anabaena* y *Nostoc* que fijan el nitrógeno en células especiales llamadas “heterocistos”. Estas algas son particularmente importantes en cultivos de suelos encharcados como el arroz, donde la fijación puede alcanzar 30 kg. de nitrógeno por hectárea y año, permitiendo un notable ahorro de fertilizantes nitrogenados y evitando la contaminación de estos suelos.

Los organismos heterotróficos no-fotosintéticos fijan el nitrógeno obteniendo la energía de compuestos del suelo, excretados por las raíces. Estas bacterias pertenecen al género *Clostridium* (anaeróbicos), *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Beijerinckia* (aeróbicos). Mediante técnicas de N^{15} ha sido posible seguir la contribución significativa del nitrógeno fijado por *Clostridium* en suelos forestales caracterizados por pHs bajos (Jurgensen and Davey, 1971). Las cantidades de nitrógeno fijadas por estas bacterias, permiten suponer que se pueden alcanzar los 100 kg. de N por hectárea y año. Son asociaciones de gran potencial agronómico, presentando especial interés la asociación de *Azospirillum* con cultivos forrajeros tropicales (*Panicum maximun*) y con cultivos de maíz, caña de azúcar, trigo, centeno y sorgo.

Bacterias promotoras del crecimiento

Una parte de los microorganismos beneficiosos, no infectivos, ha desarrollado la habilidad de colonizar la raíz, y se conocen en su conjunto como rizobacterias. Las rizobacterias beneficiosas que promueven el crecimiento de las plantas, bien específicamente mediante la secreción de hormonas o indirectamente inhibiendo organismos fitopatógenos o activando la asimilación de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo, se conocen como bacterias promotoras del crecimiento (PGPRs) y a su identificación y mecanismos de acción ha contribuido a nivel nacional el profesor Gutiérrez Mañero y su grupo de la Universidad San Pablo-CEU, con los cuales venimos colaborando en los últimos años en proyectos comunes.

Aunque la interacción de estos microorganismos con las plantas ha sido con venientemente estudiada, aún estamos lejos de entender las complejas interrelaciones metabólicas y ecológicas que resultan en efectos beneficiosos o perjudiciales para los cultivos. Uno de los mayores retos es conseguir una descripción precisa y completa de estos complejos sistemas. Este conocimiento permitiría responder a la pregunta de gran interés práctico sobre si podemos manipular los microorganismos o las plantas para conseguir una óptima asociación que resulte en mejoras de la productividad y salud de los cultivos.

A continuación pasamos a considerar algunas de interacciones en las que tenemos alguna experiencia.

Biotechnologías limpias en Agricultura

El desarrollo sostenible obliga al mantenimiento de los recursos naturales y a su conservación para presentes y futuras generaciones. El suelo es un recurso natural, con una función primordial, soportar una vegetación, y en él se deben dar las condiciones necesarias para el desarrollo permanente de la misma.

El hombre puede perturbar este recurso natural, bien sobreexplotando la productividad natural del sistema, que incapaz de regenerarse se empobrece y degrada, o mediante el vertido de residuos en una proporción muy superior a la que el medio puede absorber y transformar. El deterioro del medio hace peligrar lo que habitualmente denominamos “calidad de vida”, pero el

agotamiento de los recursos naturales, por encima del nivel de sostenibilidad, lo hace sobre el “nivel de vida”.

Sin embargo, las prácticas agrarias que se han venido utilizando en las últimas décadas para conseguir un aumento de la producción, mediante el uso de especies vegetales con una alta respuesta a la fertilización química, han conducido a la contaminación de los suelos y han causado graves problemas de eutrofización en las aguas de bebida, en ríos, lagos, lagunas y aguas subterráneas con grave repercusión sobre la salud humana.

Esta Agricultura intensiva ha reducido también la vida salvaje en las áreas rurales e inducido al deterioro de los habitats con la extinción de especies vegetales y animales, que ha conducido a la pérdida de la Biodiversidad.

Sin embargo, el mantenimiento de cierta actividad agrícola es un requisito esencial, no sólo para la producción de alimentos, sino para proteger el equilibrio ecológico, especialmente en zonas desfavorecidas y para evitar terrenos baldíos, terrenos inundados, suelos erosionados, etc.

Se hace necesario producir evitando efectos nocivos, mantener limpia la naturaleza sin pensar en grandes producciones, sino más bien atendiendo a la calidad del producto obtenido y sobre todo intentando una agricultura más respetuosa con el medio. Todo ello ha conducido a una “Nueva Agricultura” a una Agricultura Sostenible con capacidad de mantenerse y prolongarse en la agricultura del futuro.

Las prácticas biotecnológicas ofrecen una posible solución, de manera responsable, para mejorar la producción agrícola, atendiendo a las nuevas tendencias ambientales, impulsando el estudio de nuevas tecnologías que permitan aumentar la producción agrícola y forestal, en el marco de una agricultura y silvicultura sostenibles.

El Convenio sobre la Diversidad Biológica (1992) definió la biotecnología como toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos, o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos. Abarca una amplia gama de tecnologías diferentes, como el empleo de biofertilizantes, agentes de biocontrol y además incluye la manipulación, transferencia de genes o clonación de plantas, que ha llevado a la selección de genotipos de forma más rápida y selectiva. Se sigue considerando especialmente en Europa, la posibilidad de que estos avances

pueden generar riesgos potenciales para la salud humana, sobre todo cuando se trata de la introducción en el suelo de organismos genéticamente modificados (OMG), que podrían conferir resistencia a determinados agroquímicos y trastornar el equilibrio de los agro y ecosistemas, en cuanto al mantenimiento de la biodiversidad natural.

Una alternativa complementaria a la utilización de los OMGs es la potenciación del aprovechamiento de organismos nativos del suelo, bacterias y hongos (Kloepper y col. 1986) en problemas relacionados con la nutrición y protección vegetal, y su interés especialmente en países subdesarrollados, con baja productividad agrícola y con dificultades económicas.

Se abre así un campo de investigación de gran importancia, que requiere estudiarse en profundidad los procesos que tienen lugar en las interacciones planta-suelo-microorganismos, atendiendo a sus posibles repercusiones bióticas y abióticas sobre el Medio Ambiente y la Salud. Dentro de estas interacciones las simbiosis “bacteria-planta” y “hongo-planta” han sido suficientemente estudiadas, por su impacto en la Agricultura y el Medio Ambiente.

Las bacterias fijadoras de nitrógeno y los hongos micorrizicos están entre los endosimbiontes de plantas más extendidos y ecológicamente más importantes.

Fijación biológica de nitrógeno (FBN)

El nitrógeno después del agua es el principal nutriente limitante para el desarrollo de las plantas. Precisamente por esta razón en el periodo entre 1950 y 1990 se incremento 10 veces en España el uso de fertilizantes nitrogenados lo cual llevo a un aumento sin precedentes de la productividad en los cereales. Sin embargo, la aplicación de estos fertilizantes y otras acciones industriales y antrópicas han alterado las condiciones básicas del ciclo natural del nitrógeno y han contribuido a la contaminación por nitratos de los ecosistemas terrestres y acuáticos con grave riesgo para la salud humana. Los efectos sobre la salud han sido puestos de manifiesto en diversos estudios epidemiológicos y clínicos, estudios que han demostrado que la ingestión de nitratos en el agua de bebida o en alimentos conduce a la aparición de metahemoglobinemia e incluso se han relacionado con la aparición de cáncer. El nitrato se transforma en el organismo en nitrito que oxida el Fe^{2+} ferroso de la hemoglobina a Fe^{3+} férrico que es incapaz de fijar el oxígeno y transportarlo a los tejidos; es lo

que se llama enfermedad azul de los lactantes. Otro producto secundario resultante de los nitratos son las nitrosaminas, cuyo carácter cancerígeno fue demostrado por Mirvish en 1981.

El nitrógeno es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre y sin embargo es una fuente nutritiva muy escasa. Esta paradoja se debe a que el nitrógeno atmosférico es inerte y no puede ser aprovechado por la mayoría de los seres vivos, únicamente se incorpora a los sistemas biológicos cuando ha sido fijado por organismos fijadores o combinado con ciertos elementos como el hidrógeno o el oxígeno, en forma de nitrato o de amonio.

La FBN aporta la mayor parte del nitrógeno fijado a los ecosistemas terrestres. La fijación global se estima en unos 275 millones de toneladas de nitrógeno al año. De esta cantidad 30 millones de toneladas se fijan por causas naturales como descargas eléctricas, erupciones volcánicas, etc. 70 millones de toneladas se fijan mediante fijación industrial, en el proceso de Haber-Bosch, en el cual se gasta gran cantidad de energía procedente del petróleo y 175 millones de toneladas se fijan mediante fijación biológica. De estos 175 millones, 35 millones se fijan mediante fijación en vida libre y 140 millones de toneladas mediante fijación simbiótica (Sevillano y Rodríguez-Barrueco 1987).

Así pues, la Fijación Biológica de Nitrógeno representa una alternativa a la fertilización nitrogenada, y está restringida, en la actualidad, a organismos procariontes, capaces de reducir el nitrógeno molecular a amoníaco, tanto en vida libre como en simbiosis.

Las leguminosas

A partir de las experiencias de Hellriegel en 1886 se han intensificado los estudios dirigidos al estudio del proceso y al importante papel que juegan las leguminosas en el medioambiente. Las leguminosas son base de la dieta mediterránea y tienen un papel crítico en los ecosistemas naturales, en la agricultura y en el sector agroforestal, donde su habilidad para fijar nitrógeno en simbiosis, hace de ellas excelentes colonizadoras en medios deficientes de nitrógeno. Existen alrededor de 750 géneros y entre 18.000 a 19.000 especies distribuidas en 3 subfamilias: *Caesalpinodeae* con numerosas especies tropicales, *Mimosoideae* con especies arbóreas como *Acacia* sp. y

Papilionoideae con especies de elevada importancia agrícola. El 88% de las especies examinadas forman nódulos con *Rhizobium* (de Faria y col. 1989).

El éxito adaptativo de las leguminosas les permite colonizar suelos pobres en nutrientes. La abundancia de sus raíces hace también posible la mejora de las características físicoquímicas de suelos de zonas áridas y semiáridas. Su uso para pasto y mejora de suelos data de los romanos, que recomendaban en los tratados de Agricultura el cultivo alternativo de gramíneas y leguminosas, con el fin de aumentar la producción de trigo y cebada. En 1932 Fred y col., en su libro titulado *Root nodule bacteria and leguminous plants* incluyen una cita de Varro (37 BC) que dice “las legumbres deben plantarse en suelos, no tanto por su importancia como cultivo, sino como por sus buenos efectos sobre los cultivos sucesivos”.

Las bases científicas de este proceso fueron presentadas primeramente por Boussingault, a mediados del tercer decenio del siglo XIX en Francia. En 1907 en el libro de Primera Enseñanza Superior de Forcadell se puede leer: “Los agrónomos han clasificado las plantas en dos grupos: reparadoras y esquiladoras. Las primeras en lugar de empobrecer el suelo lo enriquecen, por nutrirse más de la Atmósfera que de los jugos de la tierra ...”, propiedad relativa a las plantas leguminosas.

El proceso de fijación biológica de nitrógeno, que hermana a las leguminosas con las bacterias, estableciendo un diálogo entre los dos simbioses, constituye una de las biotecnologías más sorprendentes y excepcionales, por su gran repercusión en el sector sanitario y agroalimentario. Se estima que aproximadamente 100 leguminosas agrícolamente importantes contribuyen anualmente con casi la mitad del nitrógeno fijado biológicamente. En el mundo se estima que sólo las leguminosas grano ocupan cerca de 150 millones de Hectáreas con una producción anual de 200 millones de toneladas grano.

La simbiosis *Rhizobium*- leguminosa y la actinomicorrícica se originaron en el cretácico cuando los suelos eran pobres en N combinado. La fuerte presión por la captación de N favoreció a estas plantas para establecer simbiosis con microorganismos del suelo. Su antigüedad data de, 60 a 70 millones de, años, cuando las familias mayores de angiospermas se separaron, (Doyle y Doyle 1997).

Según algunos autores la simbiosis entre las leguminosas y *Rhizobiaceas* existía ya antes de que el oxígeno existiera en la tierra y ésta puede ser la causa de las condiciones de anaerobiosis, que requiere este proceso, ya que el enzima responsable de la fijación, la nitrogenasa, que reduce el nitrógeno atmosférico a amonio es muy sensible al oxígeno.

Las leguminosas pueden realizar asociaciones simbióticas tanto con bacterias del suelo como con hongos micorrícicos. Investigaciones actuales apuntan a que los mecanismos de reconocimiento de uno u otro microsimbionte por las leguminosas son similares a nivel genético. El estudio de estos mecanismos comunes en el establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa y micorriza-planta permitirá no sólo la mejor comprensión de ambos procesos, sino también la mejor utilización de su potencial en una Agricultura Sostenible, respetuosa con el Medio Ambiente.

Breve descripción de la formación de los nódulos.

El establecimiento de la simbiosis comienza con el reconocimiento específico entre un rizobio y su planta hospedadora. La especificidad de la interacción simbiótica viene dada por el intercambio inicial de señales químicas entre la planta y el rizobio, que activan programas genéticos específicos de nodulación en ambos simbioses.

Los exudados radiculares de la leguminosa, azúcares, aminoácidos, así como compuestos flavonoides (flavonas, isoflavonas, chalconas y flavononas) atraen a las bacterias que emigran hacia sus raíces. La respuesta bacteriana, mediada por la proteína NodD constitutiva, emite a su vez señales de nodulación, el Factor Nod, para la activación y transcripción de genes implicados en el proceso simbiótico, que origina la curvatura de los pelos radiculares, la formación de células meristemáticas en la corteza de la raíz (primordio nodular) y la expresión de genes de nodulinas tempranas (ENOD12 y ENOD20). Los factores Nod son reguladores de desarrollo muy potentes, ya que su efecto se expresa a concentraciones de 10^{-8} a 10^{-12} M. Se trata de un lipo-chito-oligosacárido que induce los estadios más tempranos de la nodulación y cuya composición química difiere según el tipo de interacción.

La infección comienza con la digestión del pelo radicular por *Rhizobium* y la formación del canal de infección, siendo las bacterias liberadas por endocitosis en el citosol de las células corticales.

La raíz aísla a las bacterias recién liberadas, facilitándoles la membrana peribacteroidal, de origen vegetal, formada a expensas de cisternas de retículo endoplásmico y vesículas de Golgi. En el interior de la membrana peribacteroidal las bacterias se diferencian en bacteroides, de mayor tamaño que las bacterias en vida libre, dando lugar al “simbiosoma” o unidad fijadora de nitrógeno formada por uno o más bacteroides rodeados por la membrana peribacteroidal. El simbiosoma es un orgánulo subcelular exclusivo de raíces de leguminosas. La síntesis del enzima nitrogenasa es inmediatamente inducida en los bacteroides (genes *Nif*), que les capacita para reducir el nitrógeno atmosférico a amonio.

En algunos nódulos, en su mayoría indeterminados los bacteroides se dividen dentro de los simbiosomas, paralelamente a la multiplicación de las células infectadas para crear la zona infectada. Finalmente se llega a la formación del nódulo en el que la zona infectada está rodeada de una corteza interna y externa de donde parten los haces vasculares que transportan los fotosintatos de la planta al nódulo, y los compuestos nitrogenados en forma de amidas o ureidos elaborados por el nódulo, a la parte aérea de la planta. En nódulos indeterminados (trébol, guisante, alfalfa, etc.) existe un meristemo apical responsable del crecimiento continuo del nódulo, que no poseen los nódulos determinados (soja).

La infección de las raíces por las bacterias, puede realizarse de modo diferente al canal de infección, aunque ésta es la forma mas frecuente. Así ocurre en la simbiosis *Bradyrhizobium-Lupinus*, cuyo estudio actual en nuestro laboratorio es motivo de una Tesis Doctoral para determinar su forma de infección. Otras formas de infección se realizan por heridas producidas en la emergencia de las raíces laterales, como ocurre en el género *Arachis*, *Sylosanthes*, *Aeschynomene* y en otras plantas. En simbiosis primitivas de la familia Cesalpinoideas (p.e. en *Cassia*), y también en las papilionáceas leñosas *Andyra* e *Hymenolobium*, las bacterias no eran liberadas del canal de infección, la fijación de nitrógeno se realizaba en estas estructuras o “canales de fijación”.

Aunque la interacción *Rhizobium*-planta es bastante específica, lo que significa que cada planta será nodulada por su rizobio o rizobios característicos, sin embargo, una misma cepa bacteriana es capaz de establecer

simbiosis con diferentes leguminosas como *R. leguminosarum* que puede nodular *Pisum* y *Cicer*. El caso extremo es la especie de amplio rango de hospedador *Synorhizobium* sp. NGR234 que puede establecer simbiosis con 353 leguminosas. A su vez una misma planta puede ser nodulada por diferentes rizobios como ocurre en soja que es nodulada por *B. japonicum* y *Synorhizobium fredii*.

En todo momento, el establecimiento de la simbiosis está controlado por la planta. Es la planta la que determina que se inicie o no la infección, en función de la disponibilidad de nitrógeno combinado en el suelo y de la energía fotosintética adecuada.

Evolución de las estructuras simbióticas

La simbiosis entre leguminosas y bacterias rizobiáceas es el sistema mejor estudiado en el marco de las interacciones planta-microorganismo. Estas bacterias son simbioses facultativas, cultivados fácilmente ex-planta y accesibles a su investigación por métodos genéticos y moleculares modernos.

Todo el proceso de la fijación de nitrógeno está gobernado por genes y el uso de mutantes, defectuosos en componentes estructurales, ha sido de gran ayuda para esclarecer las distintas etapas de iniciación y desarrollo del nódulo.

Los nódulos representan un modelo apropiado para estudiar un amplio rango de funciones clave en las plantas, incluyendo la señalización inicial entre los simbioses, diferenciación celular y organogénesis, así como expresión de genes responsables del desarrollo del nódulo y su envejecimiento. Usando mutantes de diferentes leguminosas (guisante, soja, alfalfa, trébol, judía, etc.), se han identificado alrededor de 100 genes responsables del desarrollo del nódulo. De ellos, más de 40 genes han sido identificados en *Pisum sativum* que sigue siendo uno de los modelos más adecuados.

Los análisis genéticos pueden ser de gran utilidad para diferenciar los estadios más significativos de la simbiosis, cuando cada uno de ellos está controlado por uno o varios genes. De este modo se ha podido hacer un seguimiento del proceso de infección en *Medicago sativa* desde la iniciación del canal de infección, crecimiento en el interior del pelo radical y su avance en la corteza de la raíz, mediante mutantes de *Rhizobium meliloti*, defectuosos en diferentes componentes de exopolisacáridos, componentes esenciales del canal de

infección, e igualmente se ha seguido la liberación de las bacterias en la corteza radicular, diferenciación en bacteroides y formación del joven nódulo.

La secuencia funcional de los genes simbióticos de la planta, identificados mediante el uso de genotipos mutantes, coincide en general con la ordenación de los estados de desarrollo identificados en los genotipos silvestres. Sin embargo existe una excepción muy notable: las mutantes defectuosas en la autorregulación sistemática de la nodulación, usualmente retienen la capacidad fijadora de nitrógeno, por lo que la respuesta a la autorregulación no debe ser considerada como elemento a valorar en el proceso “escalonado” del desarrollo de los compartimientos simbióticos. Esto también sucede en la formación histológica del nódulo, ya que algunas mutantes de alfalfa forman estructuras pseudonodulares sin haber sido inoculadas con *Rhizobium* (Caetano-Anollés, 1992), sin capacidad para fijar nitrógeno.

Todos estos datos sugieren que el programa integral del desarrollo del nódulo no está formado por una cadena lineal de etapas sucesivas, sino por diferentes subprogramas, que son implementados en cierto grado, independientemente uno de otro, pudiendo cada subprograma a su vez constar de varios pasos sucesivos.

El más importante es el subprograma genético que ordena el desarrollo de los compartimientos simbióticos: canal de infección y simbiosomas, que separa las bacterias del citosol vegetal y asegura un diálogo íntimo entre ellos. En paralelo, los subprogramas que controlan la histogénesis del nódulo, la autorregulación de la nodulación y la diferenciación de las bacterias en bacteroides, ocupan también un especial relieve.

La identificación de los subprogramas mencionados no es en todos los casos un resultado específico de la investigación con mutantes. Es evidente que con independencia del desarrollo de los componentes simbióticos, las mutantes defectuosas en la síntesis de exopolisacáridos y lipopolisacáridos componentes específicos del nódulo, no infectan usualmente las raíces, pero inducen la formación de pseudonódulos. También se ha evidenciado que cuando los factores Nod purificados son añadidos, pueden inducir a la formación del primordio nodular e incluso estados iniciales de la estructura nodular. Sin embargo, para estudiar la inducción de los genes que se expresan en los estadios iniciales de la infección por *Rhizobium* y los genes *Nif* de fijación de nitrógeno es necesario el empleo de bacterias mutantes.

Los genes simbióticos identificados usando sus productos moleculares, son las llamadas “nodulinas” y a su estudio pionero ha cooperado el Dr. Bisseling y su grupo del Instituto de Genética Molecular de la Universidad de Wageningen. Estos componentes pueden representar más de la mitad del contenido de proteínas de los nódulos. Para identificar estos genes se han comparado espectros de proteínas (RNAs) de plantas noduladas con raíces no inoculadas. Este abordaje ha permitido diferenciar entre “nodulinas tempranas”, activadas antes de la aparición de la fijación de nitrógeno y “nodulinas tardías” que aparecen durante y después del comienzo de la fijación de nitrógeno. Nuestro laboratorio ha contribuido al estudio de estas nodulinas, en especial a la localización de la leghemoglobina, componente mayoritario del nódulo, con la función del transporte de O₂ a los bacteroides, controlando las condiciones anaeróbicas necesarias para que la nitrogenasa ejerza su función.

Algunas nodulinas están relacionadas con la formación de estructuras simbióticas, p.e. la nodulina temprana ENOD2, activamente sintetizada en el parénquima nodular, mientras que las nodulinas ENOD5 y ENOD12 están localizadas en las paredes del canal de infección (Mylona y col. 1995). La nodulina N-26, sintetizada durante la liberación de las bacterias del canal de infección, es un componente de la membrana peribacteroidal y puede estar relacionada con el transporte de nutrientes entre los simbioses. La nodulina ENOD40 está relacionada con el balance hormonal durante los estadios iniciales del establecimiento del nódulo. Esta nodulina parece controlar el cociente auxinas/citoquininas que se altera enormemente después de la inoculación con *Rhizobium* y juega un papel importante en la formación del primordio nodular y anatomía general del nódulo (Hirsch & La Rue, 1997, Mathesius y col. 1998).

Mecanismos de defensa a la infección

Inmediatamente después de la inducción de la nodulación, se inician las reacciones propias del endosimbionte en la planta hospedadora, en la que tiene especial relieve las interacciones previas a la separación de las bacterias del citosol de las células infectadas. Podrían asemejarse estos mecanismos a las reacciones de defensa de las plantas contra patógenos, que incluyen la síntesis de muchos compuestos, como ácido salicílico, quitinasa, peroxidasa, callosa, extensinas, proteínas de defensa, etc. En la nodulación las reacciones no son tan intensas como durante la patogénesis y están estrechamente relacionadas

con la especificidad de la simbiosis. La síntesis de factores de defensa es mucho más baja, no inactivando a las bacterias, pero sí controlando su número y desarrollo en los compartimientos simbióticos. El balance final de la interacción dependerá del contenido de polisacáridos exo y lipo y de los glucanos cíclicos, componentes de las paredes bacterianas. Estas moléculas de superficie, pueden inhibir los sistemas de defensa de la planta o bien hacer que las bacterias resistan a estos mecanismos. La alteración de los mecanismos de defensa comienza ya en estadios iniciales de la infección, en los cuales ocurren interacciones entre los exopolisacáridos de *Rhizobium* y los receptores de la planta. En ausencia de exopolisacáridos, estos receptores pueden ser afectados por algunos elicitores (p.e. productos de la degradación de la pared celular), induciendo una intensa respuesta inmune (Niehaus y col. 1998). Intensas reacciones de defensa pueden también estar sumamente implicadas en el desarrollo de los canales de infección, gran parte de los cuales son bloqueados o abortados en tempranos estados de preinfección (Brewin, 1998; Broughton and Perret, 1999). El grupo del Prof. Olivares Pascual ha contribuido al estudio de estos mecanismos de defensa, en plantas de alfalfa inoculadas con *Rhizobium* incompatible (Martínez Abarca y col., 1998)

Además de los mecanismos que controlan al endosimbionte en la planta hospedadora, las leguminosas tienen la capacidad de autorregular el número de nódulos formados en sus raíces, mediante señales sistemáticas hipersensibles que se comunican entre las raíces y la parte aérea de la planta. Así por ejemplo, se han seleccionado ciertos mutantes de autorregulación negativa, como plantas supernodulantes Nod⁺⁺ que generalmente mantienen la nodulación en presencia de dosis de nitrato altas (fenotipos tolerantes al nitrato) que inhibirían la simbiosis en las plantas silvestres. El aborto de excesivos canales de infección en las células corticales de alfalfa vía un mecanismo similar de reacción hipersensible, puede ser consecuencia de la respuesta de autorregulación de la planta (Vasse y col. 1993).

Simbiosis *Lupinus-Bradyrhizobium* sp.

Por ser la simbiosis mayormente estudiada en nuestro laboratorio y por tener características propias, voy a hacer una reseña muy breve de algunos de los resultados obtenidos en estos trabajos.

El lupino o altramuz es una leguminosa de origen mediterráneo gran potencialidad agrícola debido a su alto contenido de proteínas en sus semillas

(30 – 40%) que la asemeja a la soja, y su potencial como oleaginosa entre un 10-18% de aceite. Este género corresponde a la tribu Geneistae, subtribu Lupininae de la que es el único representante.

Se cultiva en Europa Central y del Norte, así como en Australia, Norteamérica y Sudamérica donde se emplea para enriquecer la harina de trigo en proteínas para pan, galletas, pastas y otros productos. Los indios peruanos utilizaban los lupinos para la alimentación desde tiempos muy antiguos, lavando las semillas en sacos colocados en los cauces rápidos de los ríos para quitarles el amargor, que se debe a su contenido en alcaloides. Actualmente la industria emplea las variedades amargas, *L. luteus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis* para la obtención de alcaloides muy apreciados en medicina.

Las plantas de *Lupinus* son poco exigentes en cuanto a la fertilidad del suelo. Pueden crecer en zonas de secano, en suelos ácidos y pobres en nutrientes. Un rasgo específico que les caracteriza es la absorción de P en suelos de bajo contenido, gracias a un sistema de raíces proteoides capaces de extraer P por su alta densidad de pelos radicales. También se caracteriza por ser una de las leguminosas de mayor tasa de fijación de N₂. Por otra parte sus inflorescencias terminales en forma de racimo, de diversos y vivos colores, son muy apreciadas en jardinería.

En España, su cultivo decayó a partir de los años 60 debido al empleo tradicional de variedades de alto contenido en alcaloides que exigía para su consumo un desamargado costoso y difícil. En la actualidad existen variedades dulces con bajo contenido en alcaloides, mejoradas por investigadores alemanes.

Respecto a su nodulación, este género presenta diversas características propias que le diferencian de otras leguminosas. El nódulo de lupino es un subtipo especial y único dentro de los nódulos indeterminados, por lo que se le ha llamado “lupinoide”, carece de meristemo terminal, presentando el meristemo una localización basal-lateral. Es la única leguminosa de clima templado que transporta el N fijado en los nódulos a la parte aérea, en forma de amidas, y es nodulada por bacterias del género *Bradyrhizobium*.

El proceso de infección es diferente, no sigue el patrón estándar, ya que no se observan cordones de infección. A su conocimiento ha contribuido recientemente nuestro grupo de investigación, mediante la realización de una

tesis doctoral que estamos dirigiendo y que se presentará en breve en la Universidad Autónoma de Madrid .

Nuestra aportación a la estructura-función de esta simbiosis, se ha dirigido al estudio de las características estructurales del nódulo y su funcionamiento fisiológico. Una de nuestras aportaciones más significativas se refiere al estudio de los mecanismos de regulación de O_2 , dado el interés del control de su concentración en el proceso simbiótico. Mediante técnicas inmunocitoquímicas localizamos específicamente la leghemoglobina, de composición similar a la hemoglobina, en el citosol de las células infectadas (Vivo y col. 1989). Esta proteína es mayoritaria en el nódulo y uno de los reguladores de O_2 más importantes. Transformándose en oxileghemoglobina transporta este elemento a los bacteroides para su respiración, manteniendo una atmósfera microaeróbica. También identificamos otro componente de la regulación de O_2 en los nódulos, la barrera morfológica de resistencia a la difusión de O_2 , en la corteza interna del nódulo (de Lorenzo, Tesis doctoral 1992) a nivel de sus componentes estructurales y la localización de ciertas glicoproteínas que regulan su operación en condiciones de estrés de la planta (Ianneta et al 1993; de Lorenzo y col. 1993).

La localización del enzima catalasa en los peroxisomas de las células infestadas permitió conocer el papel de estos microbodies durante el desarrollo natural y en condiciones de estrés de la planta (de Lorenzo y col. 1990).

Otras aportaciones de interés han ido dirigidas a conocer el papel de los plastidios en el desarrollo nodular mediante la localización de proteínas de hierro en estos orgánulos, como ferritina, cuyo contenido aumenta con la senescencia, regulando la concentración de hierro catalítico en las células infectadas y retrasando la senescencia nodular. (Lucas y col. 1998) y la localización del enzima nitricóxido sintasa, estudiada por vez primera en plantas (Cueto y col., 1996)

También nuestro laboratorio ha sido pionero en la localización de alcaloides “in situ” en las semillas de varias especies de lupino, amargas y dulces, mediante la obtención y utilización de anticuerpos específicos tipo lupanina (Pozuelo y col. 2000), en colaboración con el Dr. Greirson del *Chemical Centre*, Perth (Australia).

Objetivos biotecnológicos. Estrategias.

Los estudios de genética molecular sobre bacterias fijadoras de nitrógeno van dirigidos a obtener cepas más eficientes y competitivas, que sean buenas fijadoras de N₂. También es necesario que la planta huésped esté bien desarrollada para aportar suficiente energía para la realización del proceso simbiótico. Las condiciones óptimas de los dos simbioses, planta y microorganismo, van a ser decisivas para lograr la máxima productividad y calidad de la legumbre.

Poco a poco las empresas del sector agrícola van interesándose por la producción de inoculantes de *Rhizobium* para transferir a la agricultura esta biotecnología.

Se investiga la obtención de cepas con genes capaces de reciclar el hidrógeno que se desprende en el proceso de la FBN, construyendo cepas con hidrogenasas oxidativas que reciclan el hidrógeno (genes *hup*), que se han caracterizado ya en *B. japonicum* y en *R. leguminosarum*, pero que todavía se enfrentan a diversos problemas, siendo el Prof. Ruiz Argüeso y su grupo, laboratorio de referencia para estos estudios (Ruiz Argüeso y col. 2000).

Además de los genes *hup* se han descrito también otros métodos que mejoran la efectividad de las cepas. Se han obtenido mutantes de *B. japonicum* por mutagénesis química, con capacidad superior a las cepas silvestres, o cepas de *R. leguminosarum* resistentes a la acidez. La adición exógena de flavonoides a los inoculantes es otro de los procedimientos prometedores para aumentar la nodulación de los inoculantes comerciales.

La competitividad entre cepas representa un problema económico importante. Es primordial que la cepa de *Rhizobium* seleccionada sea efectiva en condiciones de campo. Una de las estrategias actuales es construir leguminosas que restrinjan la nodulación de cepas nativas y permitan el establecimiento de las cepas inoculadas, o la utilización de cepas que produzcan antibióticos para inhibir la nodulación de las cepas nativas. Sin embargo una seria objeción al uso de esta estrategia reside en su impacto sobre las poblaciones microbianas de la *Rhizosfera* ya que pueden inhibirse bacterias Gram (-) beneficiosas para el agrosistema.

Por último también se estudia la incorporación a las cepas inoculadas, de genes que se han mostrado muy competitivos en las cepas autóctonas como son los genes responsables de las síntesis de rizopina, (genes *mos*).

Los mayores esfuerzos para mejorar la simbiosis se han centrado en las bacterias, pero la mejora de la simbiosis se obtendrá por la manipulación de la planta hospedadora. Por ello se hace necesario conocer la biología de las leguminosas a nivel básico, y elucidar los componentes genéticos de la planta que determinan la interacción. Estos avances han culminado el año 2002 con la clonación de los genes simbióticos de *Medicago* sp, *Lotus japonicus*, y *Glycine max*, y es de esperar que a partir de ahora, un mayor número de investigadores hagan uso de herramientas genéticas y genómicas para profundizar en el proceso simbiótico.

Simbiosis micorrizica.

La mayoría de las plantas presentan micorrizadas sus raíces. El hongo, una vez que alcanza la rizosfera coloniza la corteza de la raíz y desarrolla un micelio externo que a modo de sistema radical complementario ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales y agua. Puede considerarse a estos hongos como los componentes metabólicamente más activos para la captación de nutrientes.

Las ectomicorrizas tienen un gran valor en el ámbito forestal, permitiendo el establecimiento de plantas leñosas en zonas degradadas. A su estudio ha contribuido el Prof. Mario Honrubia, de la Universidad de Murcia. Aunque las plantas ectomicorrizadas ocupen solamente del 3 al 5% del total, dada la importancia de éstas en la masa de la producción arbórea, no pueden pasar desapercibidas ya que constituyen los bosques que cubren la tierra, que corresponden a las familias Pinaceae, Fagaceae, Betulaceae, Silicaceae y Tiliaceae, así como muchos miembros de otras familias como las Rosaceae, Leguminosae, Ericaceae, Juglanceae y otras. Estos hongos tienen un valor añadido en cuanto a la comercialización de sus carpóforos, comúnmente llamados setas, en la industria de la alimentación. Algunas especies tienen interés en Medicina como por ejemplo: *Calocybe gambosa*, seta de San Jorge, con propiedades hipoglucémicas; *Lactarius deliciosus*, el apreciado níscolo, puede utilizarse como indicador de la función renal; *Coprinus atramentarius*, para combatir el alcoholismo etc.

En suelos marginales, el potencial de micorrización suele disminuir drásticamente, e incluso desaparecer. Es conveniente micorrizar las plantas antes de ser transferidas a los suelos que se pretende remediar, con inóculos de hongos que además incluyan otros organismos beneficiosos. En esta dirección nuestro laboratorio está realizando trabajos de establecimiento de plantas micorrizadas de *P. halepensis* en zonas degradadas del sudeste de la comunidad de Madrid, enriqueciendo estos suelos con micorrizas autóctonas, una vez identificadas, y con bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

En los sistemas agrícolas la mayoría de las plantas forman simbiosis con micorrizas arbusculares (AM), que facilitan la absorción de agua y nutrientes, principalmente P y algunos micronutrientes. Estas simbiosis son mucho más ancestrales que la fijación de N₂ y son características de la gran mayoría de plantas contemporáneas y de otras ya desaparecidas. La hipótesis de una evolución coevolutiva de la tierra por plantas y hongos, sugiere que el origen de las plantas terrestres ocurrió debido a una integración con hongos que les suministraban agua y nutrientes, (Douglas, 1994).

Las micorrizas arbusculares pertenecen al orden *Glomales*. El hongo penetra en las células internas del cilindro cortical de las raíces donde se diferencia en estructuras ramificadas conocidas como arbuscúlos, manteniendo una estructura miceliar en el exterior de la planta, de forma que existe una conexión continua entre la planta y el suelo.

Dados los efectos de las micorrizas arbusculares y ectomicorrizas como biofertilizantes y como bioprotectores de los cultivos, su uso apropiado puede reducir la aplicación de fertilizantes y fitosanitarios. El laboratorio del Prof. Jose Miguel Barea es pionero de la aplicación de estos hongos en la Agricultura. Una de sus características más importantes consiste en que las plantas micorrizadas pueden superar situaciones de estrés sobre todo en suelos degradados por la erosión, escasez de nutrientes, estrés hídrico, salinidad, suelos contaminados con metales pesados, escombreras, etc.. Actualmente se estudia su capacidad para activar factores antioxidantes en las plantas de tipo enzimático (catalasa, peroxidasa, y superóxido dismutasa).

Es especialmente relevante su interés en fitoremediación. Inmovilizan los metales pesados en las hifas del hongo reduciendo su traslocación a la parte aérea de la planta y eliminando su paso a la cadena trófica. En la revegetación de antiguas zonas mineras, la micorrización permitió el crecimiento de plantas como *Andropogon gerardii* y *Festuca rubra* ricas en micorrizas. También se

ha observado su beneficio en suelos salinos incrementando la tolerancia de las plantas a la salinidad. (Azcón y El-Atrash, 1997). Se han sugerido varios mecanismos para justificar este comportamiento, como inducción de cambios hormonales y mejora en la capacidad de captación de agua y nutrición de la planta.

Aunque la micorrización aparece como una práctica atractiva, sin embargo, para lograr una verdadera eficacia es necesario identificar de antemano las micorrizas autóctonas de la zona de estudio, ya que se trata de enriquecer la rizosfera con algunos de los hongos indígenas que manifiestan una acción específica en el desarrollo y adaptación de la planta a las condiciones ambientales.

La dificultad de las micorrizas arbusculares, estriba en que ninguna de las cerca de 150 especies del orden *Glomales*, ha podido ser cultivada en condiciones axénicas, por lo que no ha sido posible la preparación de inoculantes comerciales. A esto hay que añadir que se trata de simbiontes obligados por lo que su aplicación tiene limitaciones y para la obtención del inóculo se hace necesario utilizar una planta hospedadora. Por el contrario, la inoculación con ectomicorrizas presenta ventajas experimentales, ya que estos hongos pueden ser cultivados *in vitro* a partir de esporas o de micelios crecidos en medios sólidos o líquidos.

Similitud entre nodulación y micorrización.

En la simbiosis micorriza-planta, al igual que en la simbiosis "Rhizobium-leguminosa se pone de manifiesto un intercambio de señales de reconocimiento y aceptación entre los simbiontes, mediado por la expresión de genes. Básicamente en el desarrollo de las micorrizas arbusculares se producen etapas similares a la simbiosis Rhizobium-leguminosa: las hifas infectivas colonizan las células corticales y forman arbusculos muy ramificados rodeados por membranas periarbusculares de origen vegetal. La cantidad de RE y vesículas de Golgi también aumenta considerablemente para asegurar la síntesis de membranas periarbusculares (Barker y col., 1998), al igual que ocurre en la simbiosis con *Rhizobium* en la formación de la membrana peribacteroidal. Las estructuras arbusculares son efímeras y unos días después de su emergencia son degradadas por la planta hospedadora, mientras que las hifas intercelulares siguen formando nuevos arbusculos (Gianinazzi-Pearson, 1996).

La infección de la raíz por las micorrizas altera la diferenciación celular, deformación del núcleo celular que con frecuencia es rodeado por las ramificaciones arbusculares, descondensación de la cromatina, debido a la alta actividad transcripcional, aumento de alfa-tubulina etc.

Por aceptar las leguminosas los dos tipos de simbiosis, se han utilizado mutantes de *Rhizobium* defectuosos en el desarrollo del nódulo para el estudio del control genético de las micorrizas. Este procedimiento ha conducido a la identificación de mutantes *Nod*⁻ y *Myc*⁻, (Gianinazzi-Pearson 1996). Las *Myc*⁻ han sido identificadas con las mutantes de guisante, en las cuales el canal de infección aborta en el interior de los pelos radiculares. Después de la inoculación con *Glomus* estos mutantes forman micelios intercelulares pero no llegan a formarse ramificaciones arbusculares. Por estos métodos se han identificado al menos cinco etapas en el desarrollo de la micorriza arbuscular: preinfección, colonización, crecimiento del micelio intercelular, desarrollo de los arbusculos y persistencia del microsimbionte.

La micorrización estimula la síntesis de proteínas "de novo", *micorrizinas*, ausentes en plantas no inoculadas, (Barker *et al* . 1998), algunas de ellas comunes en nódulos y micorrizas. Estos productos comunes incluyen algunas proteínas constitutivas de las membranas peribacteroidal y periarbuscular, algunas nodulinas tempranas (ENOD 2, NOD 1 1; ENOD 12 y ENOD 40) e incluso la leghemoglobina que también es sintetizada en las células colonizadas por arbusculos.

Similitud entre nodulación y micorrización es también evidente por el hecho de que los factores *Nod* estimulan el desarrollo de los hongos micorrícicos, (Xie y col. 1997). También los factores de defensa de la planta contra ambas infecciones son similares, originándose la síntesis de componentes líticos que desarticulan la estabilidad de ambos microsimbiontes durante la infección.

Un rango de genes comunes han sido identificados para nódulos de leguminosas y micorrizas arbusculares. Al menos parte del sistema genético de la planta que controla el desarrollo del nódulo fue originado durante la coevolución de las plantas arcaicas con los hongos micorrícicos, (Parniske 2000). Estos genes ancestrales se han ido adaptando en las leguminosas durante la evolución de la nodulación. Esta preadaptación puede incluir la habilidad de las plantas para tolerar la presencia de bacterias en la corteza radical y formar compartimentos subcelulares simbióticos. En este contexto

resulta altamente interesante la existencia de genes *nif* en hongos endomicorrízicos, (Minerdi y col. 2001), (Moulin *et. al.* 2001). La naturaleza de estas preadaptaciones serán probablemente clarificadas mediante análisis moleculares comparativos usando como planta modelo *Lotus japonicus*, (Larsen y col. 2001), cuyo genoma ha sido completamente determinado.

Existen algunas diferencias apreciables entre ambas simbiosis: la simbiosis micorrícica está menos dirigida por la planta que la simbiosis con *Rhizobium* y los sistemas genéticos que codifican el desarrollo de las hongos parecen más simples que los que controlan la nodulación. Tampoco se ha descrito hasta el momento una autoregulación sistemática de la planta como ocurre en la nodulación.

El análisis de las micorrizas arbusculares y de los nódulos fijadores de N₂ sugiere que las plantas disponen de sistemas universales para controlar sus afinidades por los microorganismos que pueden ser mutualistas o antagonistas dependiendo del simbiote, de la condiciones ambientales y de los caracteres genéticos del organismo. Estos sistemas reguladores fueron aparentemente muy importantes para la aparición en la tierra de las interacciones beneficiosas y han contribuido en gran medida al potencial adaptativo de las plantas terrestres (Provorov y col. 2002).

Por último, permítanme ustedes una breve mención sobre el uso de los microorganismos del suelo sobre el control biológico.

Biocontrol.

La mayoría de las prácticas de control de enfermedades de plantas se ha basado, bien en la resistencia genética de la planta, al manejo de la planta en su medio ambiental y sobre todo al uso de pesticidas sintéticos. Pero se hace necesario crear alternativas a estos pesticidas corrientemente usados, ya que muchos de ellos no podrán utilizarse bien debido a reglamentaciones sanitarias o al desarrollo de resistencias por parte de los patógenos del suelo.

El reto en este campo está en buscar nuevas soluciones que logren un control efectivo, minimizando las consecuencias negativas para la salud humana y el medio ambiente. El control biológico por microorganismos ofrece una poderosa alternativa al uso de compuestos fitosanitarios. La rica diversidad de microorganismos del suelo, promete una fuente inagotable para este propósito.

Se trata de que el incremento de un determinado microorganismo en la rizosfera permita suprimir una enfermedad determinada de la planta sin afectar al resto de los microorganismos de la comunidad rizosférica o a otros organismos del ecosistema.

Las rizobacterias pueden inducir una resistencia sistémica en las plantas, similar a la resistencia sistémica adquirida (SAR), que se caracteriza por la acumulación del ácido salicílico (SA) y de ciertas proteínas relacionadas con la patogénesis en las raíces. De entre ellas, la bacteria *Pseudomonas fluorescens* Gram (-) es de las más estudiadas, produciendo una amplia gama de metabolitos con capacidad antimicrobiana. Su mecanismo de acción puede deberse, bien por competencia nutricional a través de producción de sideróforos que secuestran hierro, que no puede ser usado por organismos patógenos, bien por inducción de resistencia sistémica inducida, restringiendo la penetración del patógeno en la planta y optimizando sus defensas o bien por la producción de: antibióticos, fenazinas, pioluteorinas, ácido cianhídrico etc., efectivos contra enfermedades fúngicas. También la *P. putida* ha dado buenos resultados para combatir *Fusarium* en clavel y rábano, por competencia por hierro.

La resistencia sistémica inducida (RSI) previene la patogenicidad antes que la planta sea atacada por el patógeno. Los determinantes bacterianos de la (RSI) incluyen lipopolisacáridos, sideróforos y ácido salicílico y en algunos casos ácido jasmónico y etileno.

Por lo general las mezclas de cepas nativas y la generación de cepas genéticamente modificadas son las dos estrategias más atractivas para mejorar la capacidad de las bacterias gram (-) como agentes de biocontrol.

También las bacterias Gram(+) del género *Bacillus* y *Streptomyces* han resultado muy eficaces en el control de enfermedades, aunque han recibido menor atención que las pseudomonas fluorescentes. El *B. thuringensis* es un agente de biocontrol que representa un alto porcentaje del mercado mundial de bioinsecticidas. En los estadios de esporulación produce unas proteínas cristalinas, (endotoxinas), dotadas de propiedades insecticidas que forman parte de formulaciones comerciales de bioinsecticidas. Se han obtenido mutantes de tabaco con el gen de endotoxinas, resistentes en un 75 - 100% al ataque de los insectos. Otras especies de *Bacillus* forman parte de productos de biocontrol como el *B. subtilis* efectivo contra patógenos de *Fusarium* y *Rhizoctonia*, y el *B. cereus* eficaz contra el marchitamiento de la alfalfa y la

podredumbre de las raíces de soja producida por *Phytophthora*.

Sería necesario investigar más a fondo estas interacciones para conocer sus mecanismos de acción y diseñar nuevos productos. Muchas veces el fracaso de la utilización de estas bacterias potencialmente útiles, se debe a la falta de conocimiento de los mecanismos de antagonismo con el patógeno y de la interacción con la planta. También puede deberse el fracaso de su utilización en conseguir una formulación adecuada para su aplicación. Las formulaciones actuales son diferentes, bien en forma de polvos (*Streptomyces*) o bien como preparados celulares concentrados y congelados como en el caso de *Pseudomonas* sp. En la actualidad existen cerca de 40 productos procedentes de bacterias, disponibles en el comercio para el control de los organismos fitopatógenos.

También se estudia la potenciación de los mecanismos de defensa de las plantas micorrizadas contra agentes patógenos y la posibilidad de que los hongos micorrízicos confieran a la planta mecanismos de resistencia sistémica inducida de un modo análogo a la conferida por las bacterias.

Consideraciones finales:

El potencial de los microorganismos del suelo parece ilimitado. La naturaleza en su sabiduría ha creado las soluciones para resolver todos los problemas, que aseguren la permanencia de la vida sobre la Tierra sin alterar la armonía natural del Planeta.

Corresponde a la ciencia estudiar más profundamente el potencial de organismos autóctonos del suelo, que nos han sido dados gratuitamente como el aire, el agua y la luz del sol. Con estas tecnologías se pretende, por un lado, que las plantas puedan autoabastecerse y autodefenderse en condiciones ambientales adversas, allí donde se desarrollen, y cumplir con el deber moral de cuidar nuestro planeta y dejarlo en buen estado a las generaciones venideras.

Que las interacciones beneficiosas citadas sean cada vez más entendidas y puedan repercutir: en la mejor calidad de las cosechas y en el aumento de la productividad en países en desarrollo. En este sentido el reto de extender la simbiosis a plantas como maíz y arroz, cultivos básicos en países subdesarrollados, que dependen únicamente de estos monocultivos, es todavía

una utopía, pero estamos seguros que dejará de serlo, si estamos convencidos que no habrá paz en el mundo si el desarrollo y el bienestar no llegan a todos los países de la Tierra, porque o hay futuro para todos o no hay futuro

MUCHAS GRACIAS.

Bibliografía

Azcon R. y El-Atrash F. (1997). Influence of arbuscular mycorrhizae and phosphorus fertilization on growth, nodulation and N₂ fixation in *Medicago sativa* at four salinity levels. *Biol. Fert. Soil.*, 24: 81-86

Barker S.J., Tagu D. & Delp G. (1998). Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiol.*, 116: 1201-1207

Bowen G.D. & Rovira A.D. (1991). The Rhizosphere: The hidden half of the hidden half. In: "Plant Roots: The hidden half". (Y. Waisel A. Eshel and U. Kafkafi. eds.) pp. 641-669. Marcel Dekker, New York. 641-649

Bowen G.D. & Rovira A.D. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in Agronomy*. 66: 1-102.

Brazil G.M., Kenefick L., Callanan M., Haro A., de Lorenzo V., Dowling D.N. y O'Gara F. (1995). Construction of a Rhizosphere Pseudomonad with potential to degrade polychlorinated biphenyls and detection of *bpn* gene expression in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (5): 1946-1952

Brewin N.J. (1998). Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: the structure and development of infection threads and symbiosomes. In: The Rhizobiaceae (Spaink H., Kondorosi A. & Hooykaas P. J.J., eds.), pp. 417-429. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publisher

Broughton W.J. & Perret X. (1999). Genealogy of legume-*Rhizobium* symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2: 305-311

- Caetano-Anollés G., Joshi P. & Gresshoff P.M. (1992). Nodulation in the absence of *Rhizobium*. In: Plant Biotechnology Development (Gresshoff P.M., ed.) pp. 61-70. Boca Raton, FL: CRC Press
- Cueto M., Hernández O., Martín R., Bentura M.L., Rodrigo J., Lamas S., Golvano M.P. (1996). Presence of Nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters*, 398: 159-164
- Douglas A.E. (1994). Symbiotic Interactions. 148 pp. Oxford, New York, Toronto, Oxford University Press.
- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1997). Phylogenetic perspectives on the origins and evolution of nodulation in the legumes and allies. In: Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture (Legocki A., Bothe H. and Puhler A., eds), NATO ASI Series G. Ecological Science, Vol. 39, pp. 307-312. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag
- de Faria S.M., Lewis G.P., Sprent J.I., Sutherland J.M. (1989). Occurrence of nodulation in the leguminosae. *New Phytol.*, 111: 607-6129
- Foster R.C. (1986). The ultrastructure of the rhizoplane and the rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopath.* 24, 211-234
- Foster R.C., Rovira A.D. & Cock T.W. (1983). Ultrastructure of the root-soil-interface. p. 157. The American Phytopathological Society, St Paul, MN.
- Gianinazzi-Pearson V. (1996). Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi: getting to the roots of the symbiosis. *Plant Cell*, 8: 1871-1883
- Hirsch A.M. & La Rue T.A. (1997). Is the legume nodule a modified root or stem or an organ “*sui generis*”? *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16: 361-392
- Iannetta P.P.M., de Lorenzo C., James E.K., Fernández Pascual M., Sprent J.I., Lucas M.M., Witty J.F., de Felipe M.R., Minchin F.R. (1993). Oxygen diffusion in lupin nodules. I: visualization of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.*, 44: 1461-1467
- Jenny H. & Grossenbacher K.A. (1963). Root soil boundary zone as seen in the electron microscope. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 27: 273-277

- Jurgensen M.F. & Davey C.B. (1971). Nonsymbiotic nitrogen-fixing microorganisms in forest and tundra soils. *Plant and Soil*, 34: 341-356
- de Lorenzo C., Iannetta P.P.M., Fernández Pascual M., James E.K., Lucas M.M., Sprent J.I., Witty J.F., Minchin F.R. & de Felipe, M.R. (1993). Oxygen diffusion in lupin nodules II: Mechanisms of diffusion barrier operation. *J. Exp. Bot.*, 4: 1469-1474
- de Lorenzo C. (1992). Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Madrid. E.T:S.I. Agrónomos
- Lucas García J.A. (1998). Estudio de la interacción planta-suelo-microorganismo y su aplicación en la mejora de la producción primaria de *Lupinus* sp. Tesis Doctoral. Universidad de San Pablo. CEU. 446 pp.
- Kloepper J.W., Leong J., Schroth M.N. & Teintz M. (1980). Pseudomonas siderophoros: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Curr. Microbiol.*, 4: 317-320
- Kloepper J.W., Zablotowicz R.M., Tipping EM., Lifshitz R. (1986). Emergence-promoting rhizobacteria: description and implication for agriculture. In: Swinburne TR ed. Iron, Siderofores and Plant Diseases. New York: Plenum Press, 155-164
- Kloepper J.W., Tuzun S., Kuc J.A. (1992). Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Sci. Technol.*, 2: 349-351
- Kubiena W. (1944). Suelo y formación del suelo desde el punto de vista biológico. Nuevas gráficas. Madrid. 1944
- Larsen K., Borisov A.Y., Sandal N., Madsen L.K., Tsyganov VE., Voroshilova V.A., Batagov A.O., Stougaard J., & Tikhonovich I.A. (2001). The first example of a use of achievements in model legumes to clone symbiotic genes of traditional legumes identified by means of chemical mutagenesis. Pea (*Pisum sativum* L.) gene *Sym* 35 is likely homologous to the gene *Nin* of *Lotus japonicus*. In: Abstracts of the 13th International Congress on Nitrogen Fixation. Hamilton. Canada. pp. 101

- Martínez Abarca F., Herrera-Cervera J.A., Bueno P., Sanjuan J., Bisseling T. y Olivares J. (1998). Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *MPMI*, 11(2): 153-155
- Mathesius U., Schlaman H.R.M., Spaink H.P., Sauter C., Rolfe B.G. & Djordjevic M.A. (1998). Auxin transport inhibition precedes root nodule formation on white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J*, 14: 23-34
- Minerdi D., Fani R., Gallo R., Boarino A. & Bonfante P. (2001). Nitrogen fixation genes in an endosymbiotic *Burkholderia* strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 725-732
- Molina J.A.E., Clapp C.E., Linden D.R., Allmaras R.R., Layese M.F., Dowdy R.H. & Cheng R.H. (2001). Modeling the incorporation of corn (*Zea mays* L.) carbon from roots and rhizodeposition into soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 83-93
- Moulin L., Munive A., Dreyfus B. & Boivin-Masson C. (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411: 948-950
- Niehaus K., Albus U., Baier R., Schiene K., Schroeder S. & Puhler A. (1998). Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defence system by *Rhizobium meliloti* oligosaccharides. In: Biological Nitrogen Fixation for 21st century (Elmerich C., Kondorosi A. & Newton W., eds.) pp. 225-226. Dordrecht, Boston, London: Kluwer. Academic Publishers.
- Paul A. y Clark F.E. (1989). Occurrences and distribution of soil organics. In: Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, San Diego, 81-84
- Parniske M. (2000). Intracellular accommodation of microbes by plants: a common developmental program for symbiosis and disease?. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3: 320-328
- Pozuelo J.M., Lucas M.M., de Lorenzo C., Fernández Pascual M., Maldonado S. y de Felipe M.R. (2001). Immunolocalization of alkaloids and X-Ray microanalysis of elements in lupin seeds. *Protoplasma*, 218, 104-111

- Provorov N.A., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. (2002). Developmental genetics and evolution of symbiotic structures in nitrogen-fixing nodules and arbuscular mycorrhiza. *J. Theor. Biol.*, 214: 215-232
- Rovira A.D. (1956). Plant root excretions in relation to the rizosphere effect. I. The nature of root exudate from oats and peas. *Plant and Soil*, 7: 178-194
- Ruiz-Argüeso T., Palacios J.M., Imperial S. (2000). Uptake hydrogenases in root nodule bacteria. In: E. Triplett (ed.): "Prokaryotic Nitrogen Fixation: A model system for the analysis of a biological process". Horizon Scientific Press, Wymondham, U.K.
- Sevillano F. y Rodríguez Barrueco C. (1987). Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en Agricultura. En: Avances en la biología de la Fijación de nitrógeno atmosférico. Eds: M. Megias y I. Ruiz. pp. 9-29. Universidad de Sevilla. Jurgensen y Davey. 1970
- Vasse J., de Billy F. y Truchet G. (1993). Abortion of infection during *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.*, 4, 555-566
- Vivo A., Andreu JM., de la Viña S., de Felipe MR. (1989). Immunogold localization of leghemoglobin in plants of *Lupinus albus* L. cv Multolupa. *Plant Physiology*, 90: 452-457
- Xie Z.P., Muller J., Wiemken A., Broughton W.J. & Boller T. (1997). Nod factors and Tri-iodobenzoic acid stimulate mycorrhizal colonization and affect carbohydrate partitioning in mycorrhizal roots of *Lablab purpureus*. *New Phytol.*, 139: 361-366