

UNIVERSIDAD DE GRANADA



FACULTAD DE CIENCIAS

**NUEVAS ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA FIJACIÓN SIMBIÓTICA
DE NITRÓGENO EN *Phaseolus vulgaris* CULTIVADA EN SUELOS
AFECTADOS POR ESTRESSES ABIÓTICOS**

**Chouhra Talbi
TESIS DOCTORAL
GRANADA 2011**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Chouhra Talbi
D.L.: GR 1182-2012
ISBN: 978-84-695-1156-5

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

**NUEVAS ESTRATEGIAS PARA MEJORAR LA FIJACIÓN SIMBIÓTICA
DE NITRÓGENO EN *Phaseolus vulgaris* CULTIVADA EN SUELOS
AFECTADOS POR ESTRESSES ABIÓTICOS**

**Memoria que presenta la licenciada en Biología Vegetal Chouhra Talbi
para aspirar al grado de Doctor.**

Fdo. Chouhra Talbi

**Vº Bº La directora
Fdo. María Jesús Delgado Igeño
Investigadora Científica del CSIC**

**Vº Bº El director
Fdo. Eulogio J. Bedmar
Profesor de Investigación
del CSIC**

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos de la Estación Experimental del Zaidín (C.S.I.C.), Granada, durante los años 2005-2011.

Esta Memoria de Doctorado se ha redactado siguiendo las normas de la Escuela de Posgrado de la Universidad de Granada, que indica la posibilidad de presentarla en forma de manuscritos derivados del trabajo de investigación. En esta modalidad, la tesis contiene tres manuscritos que incluyen los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. El primero de los manuscritos ya ha sido publicado y los dos restantes se encuentran en proceso de publicación.

Para cumplir con la norma de la Escuela de Posgrado, esta Memoria contiene índice, introducción general, objetivos, materiales y métodos y discusión conjunta de los resultados obtenidos en los distintos trabajos, conclusiones, así como una bibliografía general que recoge tanto las citas de los manuscritos como las que se presentan en los otros capítulos.

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral se han presentado en las siguientes reuniones científicas:

Cost Action 856/11th N-cycle Meeting.

Participación: Póster.

Título: Genotypic characterization of rhizobial strains nodulating common bean grown in Morocco dry areas.

Lugar de realización y fecha: Granada, Spain., 15-17 de septiembre de 2005.

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

XI Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).

Participación: Póster.

Título: Identificación y caracterización de aislados de judía cultivada en zonas de Marruecos sometidas a sequía.

Lugar de realización y fecha: El Escorial (Madrid), 8-10 de junio de 2006.

Autores: C. Talbi, E. J. Bedmar y M. J. Delgado.

IX Reunión Nacional del Grupo del Metabolismo del Nitrógeno.

Participación: Póster.

Título: La sobreexpresión de la oxidasa *cbb₃* en *Rhizobium etli* incrementa la tolerancia de *Phaseolus vulgaris* a la sequía.

Lugar de realización y fecha: Alicante, 23-25 de abril de 2008.

Autores: C. Talbi, C. Sánchez, E. J. Bedmar y M. J. Delgado.

International Congress on Microbial Biotechnology for Development.

Participación: Comunicación oral.

Título: Molecular characterization of *Burkholderia* species isolated from *Phaseolus vulgaris* grown in Morocco dry areas.

Lugar de realización y fecha: Marrakech, Marruecos, 2-5 noviembre 2009.

Autores: C. Talbi, M. J. Delgado, L. Girard, J. Caballero-Mellado and E. J. Bedmar.

XIII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).

Participación: Póster.

Título: Identification of *Phaseolus vulgaris*-nodulating *Burkholderia phymatum* strains isolated from Moroccan soils.

Lugar de realización y fecha: Zaragoza, 15-18 de junio de 2010.

Autores: C. Talbi, M. J. Delgado, L. Girard, A. Ramírez-Trujillo, J. Caballero-Mellado, and E. J. Bedmar.

XIII Reunión Nacional de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).

Participación: Póster.

Título: The implication of *Rhizobium etli* *cbb*₃ oxidase in the response of common bean to drought.

Lugar de realización y fecha: Zaragoza, 15-18 de junio de 2010.

Autores: C. Talbi, C. Sánchez, A. Hidalgo-García, L. Girard, E. J. Bedmar and M. J. Delgado.

III Congreso Nacional de Biodiversidad.

Participación: Póster.

Título: Identification of *Phaseolus vulgaris*-nodulating *Burkholderia phymatum* strains isolated from Moroccan soils.

Lugar de realización y fecha: Granada, 8-10 de junio de 2011.

Autores: C. Talbi, M. J. Delgado, L. Girard, A. Ramírez-Trujillo, J. Caballero-Mellado, Abdelmoumen H, Missbah M and E. J. Bedmar.

Durante el desarrollo de esta Tesis doctoral se han publicado los siguientes trabajos:

- M. J. Delgado, A. Tresierra-Ayala, C. Talbi and E. J. Bedmar. 2006. Functional characterization of the *Bradyrhizobium japonicum modA* and *modB* genes involved in molybdenum transport. *Microbiology*. 152: 199-207.
- C. Talbi, C. Sánchez, L. Girard, E. J. Bedmar y M. J. Delgado. 2009. La sobreexpresión de la oxidasa *cbb₃* de *Rhizobium etli* incrementa la tolerancia de *Phaseolus vulgaris* a la sequía. En: Avances en el Metabolismo del Nitrógeno: de la Genómica y la Proteómica a las Aplicaciones Agronómicas, Industriales y Medioambientales. Eds. M. J. Bonete y R. M. Martínez-Espinosa. Editorial Club Universitario. ISBN: 978-84-8454-806-5. 27.
- C. Talbi, M. J. Delgado, L. Girard, A. Ramírez-Trujillo, J. Caballero-Mellado, and E. J. Bedmar. 2010. *Burkholderia phymatum* capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. *Applied and Environmental Microbiology* 76: 4587-4591.
- C. Talbi, M. Argandoña, C. Vargas, E. J. Bedmar and M. J. Delgado. *Burkholderia phymatum* improves salt tolerance of symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. Enviado a publicación.
- C. Talbi, C. Sánchez C, A. Hidalgo-Garcia, E. M. González, C. Arrese-Igor, L. Girard, E. J. Bedmar and M. J. Delgado. Enhanced expression of *Rhizobium etli cbb₃* oxidase has a role in the response of common bean nodules to drought. Enviado a publicación.



﴿رَبِّ أَوْزَعْنِي أَنْ أَشْكُرَ نِعْمَتَكَ الَّتِي أَنْعَمْتَ عَلَيَّ
وَعَلَى وَالِدَيَّ وَأَنْ أَعْمَلَ صَالِحًا تَرْضَاهُ وَأَدْخِلْنِي
بِرَحْمَتِكَ فِي عِبَادِكَ الصَّالِحِينَ﴾

صَدَقَ اللهُ الْعَظِيمُ

GRACIAS A DIOS QUE ME PERMITIÓ
SEGUIR ADELANTE Y VENCER TODOS
LOS OBSTÁCULOS QUE EN EL CAMINO
SE PRESENTARON

*La presente tesis se la dedico con mucho cariño, principalmente, a mis padres **MOKHTAR** y **FATIMA** que me dieron la vida, por todo su amor, por cada uno de los sacrificios que hicieron para que se realizaran mis sueños, por su constante entrega y confianza, por ayudarme a seguir adelante a pesar de cada una de las adversidades presentadas.*

*A mi hermano **KHALID**, por su apoyo, cariño y compañía en todos los momentos de mi vida, especialmente durante mi formación academica en la que tanto ha participado, por ser parte importante de este proceso y por su ayuda incondicional en cada una de las etapas vividas. A mí cuñada **AMAL**, por su inestimable complicidad y consentirme tanto. A mi adorado sobrinillo **MOHAMED TAHA**, la vela que ilumina a toda la familia.*

*A las que nunca dudaron que lograría este sueño, mis hermanas **AMAL**, **FADOUA** y **CHAYMAE**, por estar siempre conmigo y apoyarme, por hacerme reír cuando más lo necesitaba. Os quiero muchísimo y os deseo lo mejor. A mi tita **AICHA** por el tiempo y gran esfuerzo que me dedica. Te quiero mucho.*

*A mi tío **AMKADMI MOHAMED**, por estar siempre a mi lado, gracias por tu apoyo y ayuda.*

*A mi tito **ABDELKHALEK**, a pesar de que no estas entre nosotros, se que tu alma si lo está, y porque estuviste a mi lado apoyándome en los primeros años de la realización de este trabajo. Nunca olvidaré tus consejos y los buenos momentos compartidos. Jamás te olvidaré, estarás siempre en mi corazón.*

Una vez llegado este momento, debo expresar mis más sincero agradecimiento a todas las personas que me han permitido llegar hasta aquí, a toda la buena gente que me ha rodeado durante estos años, a todos los que me hacéis sentir afortunada y feliz.

*De forma muy especial, a la Dra **María Jesús Delgado Igeño** y al Profesor **Eulogio J. Bedmar** por la dirección de esta tesis doctoral. Sus apoyos, su confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas han sido un aporte de incalculable valor no sólo en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. Muchas gracias.*

*A **Lourdes Girard** por su disponibilidad y ayuda. A **Jesús Caballero Mellado**, excelente amigo y mejor profesor, que nos dejó una excelente labor de investigación sobre *Burkholderia*. Gracias por tus consejos.*

*A **Hanae Abdelmoumen** y **Mustapha Missbah**, por formar parte de los valiosos profesores que me enseñaron a amar la Ciencia, por ofrecerme su apoyo, consejos y amistad. Gracias por los agradables momentos compartidos.*

*A la profesora **Carmen Lluch**, tutora de los cursos de Doctorado y de esta tesis, por su disponibilidad siempre que la he necesitado. No olvidaré el tiempo que pasé en su Grupo de Investigación durante el primer año del periodo de docencia. También agradecer tanto a **Carmen Iribarne** como a **Marleni Olivera** los buenos momentos compartidos en el laboratorio durante mi estancia en el departamento de Fisiología Vegetal de la Facultad de Ciencias.*

*A **Alba, Cristina, Chudi, David, Emilio, Germán, Gregorio, Juan, Manolo (Lolo), Sergio, Silvia y Soco**, la gente maravillosa que forma nuestro grupo que, por supuesto, no son sólo compañeros de trabajo, sino amigos, y de los más buenos. Gracias por el tiempo que hemos compartido, sobretodo en esas pesadas horas en las que nos poníamos a desnodular. Y, por supuesto, a las nuevas adquisiciones, **Edu** y **Maribel**. Gracias a todos por vuestra sonrisa. A **Álvaro Tresierra**, mi primer jefe, gracias por todos tus consejos.*

*Un especial agradecimiento para **Germán** y **Diana** por su disponibilidad permanente y ayuda en el tema de la estadística.*

*A los compañeros que han pasado por el laboratorio, en especial **Cinta** y **Nadia El Batanony** con los que he compartido muy buenos momentos.*

Fuera de las paredes de nuestro laboratorio, muchas gracias a todos los compañeros del Grupo de Interacciones Planta-Bacteria-Medio Ambiente de la EEZ, por vuestra ayuda y consejos siempre que lo he necesitado. A mis compañeros de la EEZ, por todos los momentos agradables que hemos pasado juntos.

*Al grupo del departamento de Ciencias del Medio Natural de la Universidad Pública de Navarra, en particular a **Esther González** por su colaboración, dedicación y rapidez en los análisis de malato y adenilatos. Muchas gracias*

*Al servicio de microscopia de la EEZ, en especial al Dr **Juan de Dios Alché** y a **Alicia**, mil gracias por vuestro trato cordial, por vuestros consejos y por introducirme en un mundo que me ha fascinado.*

*A **Esther, Hakima, Kahdija** y **Rajaa**, mi “otra” familia, con quien tantos buenos momentos y risas he compartido. Gracias, de corazón.*

Por si me olvido de alguien, muchas gracias a todos los que han participado en la elaboración de esta tesis. Los que por algún motivo particular están fuera, siempre estarán presente para mí.

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ABA	ácido absísico
ADNr	ácido desoxirribonucleíco ribosómico
AIA	alanina
Ap	ampicilina
ARA	actividad reductora de acetileno
ARN	ácido ribonucleíco
ATP	adenosin trifosfato
<i>bv</i>	biovariedad
BSA	albúmina sérica bovina
BDO	barrera de difusión de oxígeno
C	carbono
°C	grados centígrados
CA	anidrasa carbónica
cDNA	DNA complementario
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxinucléosido trifosfato
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
eds	Editores
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
FBN	fijación biológica de nitrógeno
g	gramos
Gm	gentamicina
GOGAT	glutamato sintasa
GS	glutamina sintitasa
h	horas
HEPES	ácido hidroxietilpiperacina-etanosulfónico
H ₂ O ₂	peroxido de hidrógeno
IA	invertasa alcalina
Kb	kilo pares de bases
KDa	kilodalton
L	litro
Lb	leghemoglobina
LB	Lauria-Bertani

M	Molar
Mes	ácido morfolinoetanosulfónico
MDH	malato deshidrogenasa
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
MM	medio mínimo
N ₂	nitrógeno molecular
NADP ⁺ /H	nicotinamida adenín denucleótido fosfato
NAD	nicotinamida adenin dinucleotido
NCBI	Nacional Centre for Biotechnology Information
ng	nanogramos
NH ₄ ⁺	amonio
nm	nanometros
NN	número de nódulos
O ₂	oxígeno molecular
OAA	oxalacetato
pb	pares de bases
PBS	solución de tampón fosfato
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDW	peso seco de plantas
PEP	fosfoenolpiruvato
PEPC	fosfoenolpiruvato carboxilasa
pmol	picomoles
PMSF	fenimetilsulfonilfluoruro
prot	proteínas
PVPP	polivinilpolipirrolidona
rpm	revoluciones por minuto
redox	reducido/oxidado
REP	repetitive extragenic plandromic
rep/PCR	repetitive extragenic plandromic PCR
ROS	especies reactivas de oxígeno

s	segundo
SDS	sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	electroforesis en gel de policrilamida en presencia de SDS
sp	species
SS	sacarosa sintasa
TBE	tampón tris-borato-EDTA
Tc	tetraciclina
TCA	ácido tricloroacético
Tm	toneladas métricas
Tris	tris-hedroximetil-aminometano
v	volumen
UDP	uridina difosfato
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	micromolar
UFC	unidades formadoras de colonias
UPGMA	unweighted pair group method using arithmetic averages
YEM	yeast extract manitol

ÍNDICE

ÍNDICE	I
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	
1.1. Ciclo del N: fijación biológica de N ₂ y desnitrificación	1
1.2. Fijación simbiótica de N ₂ . Infectividad, efectividad y actividad	4
1.3. Simbiosis fijadoras de N ₂	8
1.3.1. Simbiosis Frankia-plantas actinorrícicas. Otros actinomicetos	8
1.3.2. Simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosa	9
1.4. Otras bacterias, no-rizobios, que forman simbiosis fijadoras de N ₂ con leguminosas	12
1.5. Otros rizobios que no nodulan leguminosas	13
1.6. Otros rizobios que no se aislaron de nódulos de leguminosas	13
1.7. Mecanismos de protección frente al oxígeno en nódulos de leguminosas	16
1.7.1. Barrera de difusión al oxígeno	16
1.7.2. Leghemoglobina	18
1.7.3. La oxidasa terminal <i>cbb</i> ₃	19
1.8. Estrés abióticos y fijación simbiótica de N ₂	21
1.8.1. Sequía y fijación de nitrógeno por los nódulos	21
1.8.1.1. Efecto en el flujo de oxígeno al nódulo	22
1.8.1.2. Efecto en el metabolismo carbonado de los nódulos	23
1.8.1.3. Efecto en el metabolismo nitrogenado de los nódulos	26
1.8.1.4. Respuesta de los nódulos a sequía	28
1.8.2. Estrés salino, osmoadaptación y solutos compatibles en rizobios	29
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS	39
3.2. MEDIOS DE CULTIVO, Y CONSERVACIÓN DE CEPAS	41
3.2.1. Medio de cultivo para <i>E. coli</i>	41
3.2.2. Medio de cultivo para <i>Rhizobium</i>	41

3.2.3. Medios de cultivo para <i>Burkholderia</i>	41
3.2.3.1. Medio TY	41
3.2.3.2. Medio BAc	42
3.2.3.3. Medio MJV	42
3.2.3.4. Medio BSE	43
3.2.4. Otros medios	43
3.2.4.1. Medio Yeast Extract-Mannitol Agar (YEMA)	43
3.2.4.2. Medio M79	44
3.2.5. Conservación de cepas bacterianas	44
3.2.6. Antibióticos	44
3.3. TOMA DE MUESTRAS Y CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO. EXPERIMENTOS DE PLANTA-TRAMPA Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDOSIMBIÓTICAS DE NÓDULOS DE <i>Phaseolus vulgaris</i>	45
3.3.1. Toma de las muestras de suelo	45
3.3.2. Características físico-químicas del suelo	45
3.3.3. Experimentos de planta-trampa	45
3.3.4. Esterilización de nódulos de judía y aislamiento de sus endosimbiontes	47
3.4. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE LAS CEPAS AISLADAS DE NÓDULOS DE JUDÍA	47
3.4.1. Extracción de ADN genómico	47
3.4.1.1. Método tradicional	47
3.4.1.2. Método comercial	48
3.4.2. Cuantificación del ADN	49
3.4.3. Identificación de <i>Burkholderia phymatum</i>	49
3.4.3.1. REP-PCR: Repetitive Extragenic Palindromic (REP)-Polymerase Chain Reaction (PCR)	49
3.4.3.2. Amplificación del gen 16S rRNA	51
3.4.3.3. Amplificación de los genes simbióticos <i>nifH</i> y <i>nodC</i>	52
3.4.3.5. Purificación de los productos de amplificación	54
3.4.4. Secuenciación de ADN y análisis informático de las secuencias	54
3.5. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE <i>B. phymatum</i> GR01	55
3.5.1. Perfil de proteínas totales	55

3.5.2. Resistencia natural a antibióticos	56
3.5.3. Utilización de fuentes de nitrógeno y de carbono y actividades enzimáticas	56
3.5.4. Dendrograma basado en las características fenotípicas	56
3.5.5. Actividad nitrogenasa en vida libre	57
3.6. EFECTO DE ESTRESSES ABIÓTICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE <i>B. phymatum</i> GR01	58
3.6.1. Efecto de la salinidad	58
3.6.2. Efecto de la sacarosa	58
3.6.3. Efecto del pH	58
3.7. OBTENCIÓN DE CEPAS DE <i>Rhizobium</i> Y <i>Burkholderia</i> QUE EXPRESAN PROTEÍNAS FLUORESCENTES	59
3.7.1. Transformación de <i>B. phymatum</i> GR01N y <i>R. tropici</i> CIAT899R	59
3.7.2. Comprobación de la inserción en el cromosoma	59
3.7.3. Amplificación y secuenciación de los genes <i>dsred-a</i> y <i>gfp-a</i>	60
3.8. PRODUCCIÓN DE SOLUTOS INTRACELULARES POR <i>B. phymatum</i>	61
3.8.1. Cultivo bacteriano	61
3.8.2. Extracción de solutos intracelulares	61
3.8.3. Identificación de solutos intracelulares	62
3.9. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS, GERMINACIÓN E INOCULACIÓN DE LAS PLÁNTULAS. CULTIVO DE PLANTAS	62
3.9.1. Esterilización de semillas y germinación	62
3.9.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas	64
3.9.3. Preparación de inóculos bacterianos	65
3.9.4. Cultivo de plantas	65
3.9.4.1. Cultivo en jarra Leonard	65
3.9.4.2. Cultivo en maceta	65
3.9.4.3. Cultivo en tubo de vidrio	65
3.10. EFECTO DE LA SAL EN LA SIMBIOSIS <i>P. vulgaris</i> - <i>B. phymatum</i> y <i>P. vulgaris</i> - <i>R. tropici</i> .	66

3.10.1. Inoculación y cultivo de plantas. Peso seco y contenido en N de las plantas. Contenido en leghemoglobina de los nódulos	66
3.10.2. Ocupación de nódulos de judía basada en el empleo de antibióticos	67
3.10.3. Emisión de fluorescencia por células en vida libre	67
3.10.4. Ocupación de nódulos de judía basada en la emisión de fluorescencia	68
3.10.5. Infección de <i>P. vulgaris</i> por <i>B. phymatum</i>	68
3.11. RESPUESTA A LA SEQUÍA DE PLANTAS DE <i>P. vulgaris</i> INOCULADAS CON <i>R. etli</i> CFNX713	68
3.11.1. Inoculación y cultivo de plantas	68
3.11.2. Actividad nitrogenasa de los nódulos	69
3.11.3. Aislamiento de bacteroides	69
3.11.4. Detección de citocromos <i>c</i> en bacteroides	69
3.11.4.1. Preparación de membranas celulares	69
3.11.4.2. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida [Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)-Polyacrilamide Gel Electrohoresis (PAGE)] (SDS-PAGE)	70
3.11.4.3. Transferencia a membranas de nitrocelulosa	71
3.11.4.4. Detección de citocromo <i>c</i> mediante quimioluminiscencia	71
3.11.4.5. Determinación de proteína	71
3.11.5. Actividad respiratoria de los bacteroides	72
3.11.5.1. Calibración del electrodo de oxígeno	72
3.11.5.2. Determinación de la actividad respiratoria	73
3.11.6. Extracción de proteínas solubles del nódulo	73
3.11.7. Determinación de ácidos orgánicos del nódulo	73
3.11.8. Determinación de adenilatos (carga energética)	74
3.11.9. Contenido en azúcares	74
3.11.10. Actividad sacarosa sintasa	75
3.12. EXPRESIÓN DEL GEN <i>PvSSn</i> EN NÓDULOS DE JUDÍA	76
3.12.1. Aislamiento de ARN total	76
3.12.2. Síntesis de cDNA	77
3.12.3. Amplificación del gen <i>PvSSn</i>	77

3.12.4. Análisis estadístico	79
------------------------------	----

4. RESULTADOS

4.1. TRABAJO I. *Burkholderia phymatum* capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils

4.1.1. Abstract	87
4.1.2. Introduction	87
4.1.3. Material and methods	88
4.1.3. Results and discussion	89
4.1.4. Acknowledgments	96

4.2. TRABAJO II. *Burkholderia phymatum* improves salt tolerance of symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*

4.2.1. Abstract	103
4.2.2. Introduction	103
4.2.3. Material and methods	105
4.2.4. Results	108
4.2.5. Discussion	117
4.2.6. Acknowledgments	119

4.3. TRABAJO III. Enhanced expression of *Rhizobium etli cbb₃* oxidase has a role in the response of common bean nodules to drought

4.3.1. Abstract	125
4.3.2. Introduction	125
4.3.3. Materials and methods	127
4.3.4. Results	131
4.3.5. Discussion	142
4.3.6. Acknowledgments	144

5. DISCUSIÓN GENERAL	
5.1. <i>Burkholderia phymatum</i> , aislada de suelos de Marruecos, forma nódulos efectivos en <i>Phaseolus vulgaris</i>	147
5.2. <i>Burkholderia phymatum</i> mejora la tolerancia a salinidad de la fijación simbiótica de nitrógeno en <i>Phaseolus vulgaris</i>	150
5.3. Papel de la sobreexpresión de la oxidasa terminal <i>cbb₃</i> de <i>Rhizobium etli</i> en la respuesta de los nódulos de judía a sequía	153
6. CONCLUSIONES	159
7. BIBLIOGRAFÍA GENERAL	163
8. ANEXO	191

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. Ciclo del N: fijación biológica de N_2 y desnitrificación

El nitrógeno (N) es, con la excepción del agua, el nutriente limitante más común en la práctica de la Agricultura. Es, además, un elemento esencial para todas las formas de vida ya que forma parte de moléculas orgánicas tan importantes como los aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hormonas, etc. A pesar de su abundancia en la atmósfera como dinitrógeno (N_2), su utilización no puede llevarse a cabo por la mayoría de los seres vivos, sino tan sólo por un grupo de microorganismos procariotas, los diazotrofos, que tienen la capacidad de reducirlo a amonio. Este proceso de reducción se conoce como fijación biológica de N_2 y se lleva a cabo por microorganismos tanto en vida libre como en simbiosis con plantas leguminosas y actinorrícicas.

La capacidad de fijar N_2 está ampliamente distribuida entre los procariotas y es compatible con ambientes muy variados y una gama amplia de características fisiológicas. Se estima que, en total, se fijan aproximadamente 275 millones de toneladas métricas de N_2 al año, de los que 30 se deben a causas naturales, como descargas eléctricas o erupciones volcánicas, 70 proceden de la fijación industrial para la producción de fertilizantes nitrogenados mediante el proceso Haber-Bosch, y 175 de la fijación biológica (de Felipe, 2006). Por tanto, la fijación biológica de N_2 es un proceso fundamental para la vida en nuestro planeta ya que repone el contenido total de N en la biosfera y compensa las pérdidas que ocurren por desnitrificación (Philippot et al. 2007) (Figura 1).

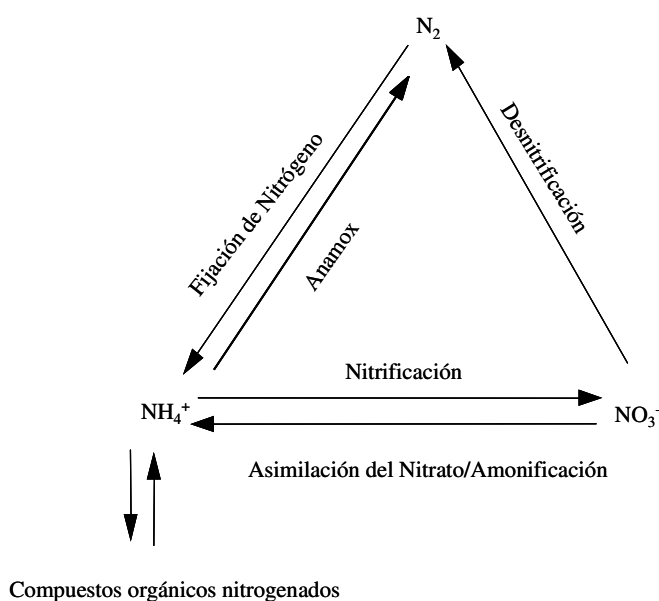
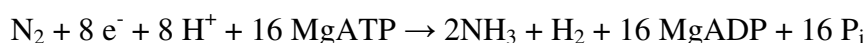


Figura 1. Ciclo del nitrógeno

La enzima clave de la fijación de N₂ es la nitrogenasa. Casi todos los diazotrofos tienen una nitrogenasa que consta típicamente de una ferroproteína (Fe-proteína) o nitrogenasa reductasa y de una molibdoferroproteína (MoFe-proteína) o nitrogenasa. Cuando en el medio no hay disponibilidad de molibdeno, algunas bacterias, como *Azotobacter vinelandii* o *Rhodobacter capsulatus*, inducen la síntesis de nitrogenasas alternativas que contienen vanadio o hierro en lugar de molibdeno (Dixon y Kahn, 2004). La reacción estequiométrica de la reducción de N₂ catalizada por la nitrogenasa, en condiciones óptimas, es la siguiente:

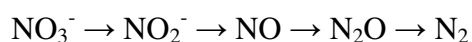


El mecanismo enzimático de actividad de la nitrogenasa requiere la reducción de la Fe-proteína por donadores de electrones como la ferredoxina o la flavodoxina, la transferencia (dependiente de la hidrólisis de MgATP) a la MoFe-proteína de electrones, y finalmente, la transferencia interna de electrones en la MoFe-proteína. Una parte importante del poder reductor que se utiliza para fijar N₂ se pierde en forma de hidrógeno (H₂) a causa de una reacción colateral e inevitable catalizada por la nitrogenasa, lo que representa una fuente de ineficiencia energética del proceso de fijación. Para más información sobre la enzima nitrogenasa ver apartado 1.7. Algunas bacterias poseen un sistema hidrogenasa capaz de oxidar el H₂ producido, lo que les permite recuperar parte del poder reductor utilizado en su síntesis. De esta manera se mejora la eficiencia energética del sistema de fijación de N₂ (Imperial et al. 2006).

Durante el período comprendido entre los años 1950-1990 se incrementó 10 veces el uso de fertilizantes nitrogenados en España, lo que junto con otras acciones industriales y antrópicas, ha resultado en la contaminación por nitratos (NO₃⁻) y nitritos (NO₂⁻) de suelos y aguas. Esta contaminación ha originado, por una parte, graves problemas para la salud humana, como la aparición de metahemoglobinemia, afecciones respiratorias, e incluso se ha relacionado con la aparición de cáncer (de Felipe, 2006). Por otra parte, en las aguas superficiales, el exceso de N puede causar eutrofización, lo que resulta en un aumento de la fotosíntesis y dar lugar, a su vez, a importantes cambios en la composición, estructura y dinámica de los ecosistemas, produciendo, en general, un incremento de la biomasa y un empobrecimiento de la biodiversidad.

La desnitrificación es el único proceso biológico por el que los nitratos y nitritos pueden convertirse en N₂, que vuelve de nuevo a la atmósfera, cerrándose así el ciclo

del N en la biosfera (Figura 1). Desde el punto de vista bioquímico, la desnitrificación es una forma alternativa de respiración por la que, en condiciones limitantes de oxígeno, el nitrato y sus óxidos de nitrógeno derivados actúan como aceptores finales de electrones en una cadena de transporte hasta la formación de N₂, de acuerdo con la siguiente reacción:



Los microorganismos capaces de llevar a cabo la desnitrificación completa, esto es, la reducción de nitrato/nitrito a N₂ son muy escasos, ya que la mayoría de ellos sólo realizan una desnitrificación parcial, o incompleta, lo que se debe a que no poseen, o no expresan, el equipo enzimático necesario para llevar a cabo todos y cada uno de los procesos de reducción que conforman la desnitrificación. Es, por tanto, una paradoja que siendo la desnitrificación el único proceso biológico conocido para eliminar el exceso de nitratos que contaminan los ecosistemas terrestres y acuáticos, sea también un mecanismo cuyos productos intermediarios tienen un enorme impacto sobre la contaminación atmosférica. Así, el óxido nítrico (NO) y el óxido nitroso (N₂O) son potentes gases invernadero que se liberan a la atmósfera e intervienen en la formación de la lluvia ácida, en el calentamiento global de la atmósfera y en la destrucción de la capa de ozono. El óxido nitroso es 320 veces más activo que el dióxido de carbono (CO₂) en el calentamiento de la atmósfera, por lo que este gas invernadero es uno de los más perjudiciales. El N₂O se concentra en la troposfera y actúa reflejando los rayos solares de nuevo a la tierra. En la estratosfera el óxido nítrico y el óxido nitroso destruyen la capa de ozono que protege la tierra de la luz ultravioleta. El NO también se puede convertir químicamente en NO₂⁻ que, a su vez, puede hidratarse para formar HNO₂ y HNO₃ que caen a la tierra como constituyentes de la denominada lluvia ácida. Por otra parte, el NO es una importante molécula señal que desempeña diferentes funciones en los sistemas biológicos, tanto eucariotas como procariotas. Por todo ello, el exceso de nitratos no sólo afecta a los ecosistemas terrestres y marinos, sino que también contribuye a la liberación a la atmósfera de gases invernadero como el óxido nítrico y el óxido nitroso.

Durante mucho tiempo se ha considerado que la fuente de enriquecimiento del aire en óxido nitroso era la creciente utilización de los combustibles fósiles. Sin embargo, es ahora sentir general que, de forma principal, su origen está en la actividad microbiana

de suelos y aguas, enriquecidas en nitratos por la aplicación masiva de fertilizantes nitrogenados. Aunque el empleo de tales fertilizantes ha supuesto un considerable incremento en la producción de alimentos, también ha ocasionado efectos colaterales no deseables, como es la creciente contaminación del medioambiente. Más de la mitad del fertilizante que se aplica al suelo termina en ríos, lagos y mares, contribuyendo a su eutrofización y al crecimiento masivo de algas en las plataformas marinas (Díaz y Rosenberg, 2008).

1.2. Fijación simbiótica de N₂. Infectividad, efectividad y actividad

En la búsqueda de prácticas agrícolas que sostengan una productividad elevada a la vez que disminuyan el impacto negativo causado por el empleo abusivo de los fertilizantes nitrogenados es donde la fijación simbiótica de N₂ tiene una enorme importancia económica, ecológica y agrícola ya que se puede considerar como una alternativa, todavía parcial, a los fertilizantes químicos. Como se ha indicado, de los 175 millones de Tm que la fijación de N₂ suministra a los ecosistemas terrestres, 140 millones se aportan mediante la fijación simbiótica. Este proceso tiene lugar gracias a la asociación mutualista que establecen algunas bacterias diazotrofas con plantas superiores. Estas simbiosis mutualistas se caracterizan porque consecuencia directa del proceso de infección de las plantas por las bacterias es la formación de nódulos, órganos donde las células vegetativas se transforman en bacteroides, células especializadas que sintetizan la enzima nitrogenasa y donde, por tanto, se lleva a cabo la reducción de dinitrógeno a amonio. La asociación simbiótica entre planta y bacteria implica una complementación nutricional recíproca: mientras que la planta recibe N₂ fijado en forma de amonio, la bacteria dispone de productos hidrocarbonados y aminoácidos como fuentes de carbono y nitrógeno.

El establecimiento de una simbiosis eficiente requiere una secuencia de etapas independientes que definen las llamadas propiedades simbióticas, que son resultado de la expresión de características propias de la bacteria, de la planta hospedadora y de la asociación de ambas. Estas propiedades son a) especificidad, o capacidad de interactuar a nivel molecular específicamente de forma que la bacteria se adhiere a la raíz e induce en ella la diferenciación del primordio nodular; b) infectividad, o capacidad de penetrar en el tejido radical de la planta hospedadora y formar un canal de infección hasta llegar al nódulo; y c) efectividad, o capacidad de transformarse en bacteroides y reducir el

nitrógeno atmosférico a amonio en el nódulo (Revisado por Morón et al. 2006; Oldroyd y Downie, 2008; Jones et al. 2007; Oldroyd et al. 2011)

La primera etapa en el proceso de infección es el crecimiento de los microsimbiontes en la rizosfera de las plantas con las que se asocian. Las raíces de las plantas exudan una serie de compuestos de bajo peso molecular, entre ellos varios aminoácidos y azúcares, glicoproteínas, flavonoides y otros compuestos fenólicos que actúan como atrayentes quimiotácticos para las bacterias.

En general, el establecimiento de una simbiosis efectiva es un proceso complejo en el que es imprescindible el intercambio de señales específicas entre los simbioses. En el caso de *Rhizobium*, este diálogo molecular, se inicia con la liberación, por parte de la planta, de una serie de compuestos contenidos en las semillas y, sobretodo, exudados por la raíz, como son flavonoides, ácidos aldónicos y betaínas. Estos compuestos, a su vez, inducen en sus microsimbiontes la expresión de los genes de nodulación (genes *nod*), lo que origina la producción de los denominados factores de nodulación (factores Nod), moléculas señal que tienen un papel fundamental en el inicio del desarrollo de nódulo y en la invasión bacteriana. Los factores Nod están formados por un esqueleto básico de quitina (*N*-acetil-*D*-glucosamina) al que se une un ácido graso a través del N del extremo no reductor. Esta estructura básica puede presentar diferentes modificaciones adicionales, así como variaciones en la longitud y el grado de saturación del ácido graso. El correcto reconocimiento de un factor Nod requiere la presencia de unos receptores tipo RLK (Receptor-Like Kinases) de la familia LysM, específicos de la superficie de las células del pelo radical, lo que determina la especificidad de la interacción planta- bacteria.

Tras la percepción de los factores Nod por la planta, se produce la transducción de la señal que conduce a una oscilación de los niveles de calcio en la zona perinuclear de los pelos radicales. Este proceso parece responsable de la inducción de la expresión de diversos genes de la planta que se produce durante los primeros estadios de la nodulación, por lo que a las proteínas que codifican se las denominan nodulinas tempranas (ENOD). Además, los factores Nod tienen la capacidad de inducir la reorganización del esqueleto de actina, la formación de pelos radicales y/o la deformación de los ya existentes, así como la formación del cordón de preinfección en las células del córtex externo, a través del cual se produce el crecimiento del cordón de infección (Morón et al. 2006; Oldroyd y Downie, 2008; Oldroyd et al. 2011; Robledo et al. 2011).

La infección bacteriana comienza con la adhesión de las bacterias de forma individual a la epidemis de la raíz, generalmente a las células del pelo radical, facilitada por la unión entre las lectinas de la pared celular de la planta con una glicoproteína de superficie de la bacteria denominada rihadhesina. A la unión y agregación bacteriana irreversible a la superficie de la raíz contribuye la acumulación de bacterias en la superficie del pelo radical de la planta hospedadora mediante la producción de una variedad de componentes bacterianos tales como microfibrillas de celulosa extracelulares, polisacáridos capsulares, exopolisacáridos, lipopolisacáridos y β -1,2-glucanos. La importancia de los polisacáridos bacterianos en el establecimiento de la interacción simbiótica y el posterior desarrollo del proceso infectivo es crítica ya que, además de su implicación en la competitividad de las cepas, se ha demostrado que mutantes defectivos en la síntesis de los mismos presentan escasa infectividad, baja capacidad para nodular y, en algunos casos, alteraciones en el rango de hospedador (Frayse et al. 2003).

La primera respuesta visible de la planta tras el contacto con su microsimbionte específico es la deformación y posterior curvatura del pelo radical por estimulación local del crecimiento del extremo apical del mismo. Las bacterias atrapadas en la curvatura del pelo radical penetran en éste debido a la degradación localizada de su extremo apical por la acción hidrolítica de poligalacturonasas, pectinasas, celulasas y hemicelulasas bacterianas (Oldroyd y Downie, 2008; Oldroyd et al. 2011; Robledo et al. 2008; 2011). Una vez que la bacteria se encuentra en el interior de la planta, el núcleo celular del pelo radical migra hacia el sitio de infección para comenzar la síntesis de nuevo material similar al que constituye la pared celular. Esta nueva pared continúa su desarrollo alrededor de las bacterias y en dirección a las células corticales de la raíz, originando de esta forma una estructura tubular, denominada cordón de infección.

Las células bacterianas continúan su división y crecimiento a medida que el cordón de infección avanza hacia determinadas células corticales, que inician simultáneamente su división formando el primordio nodular. El primordio está separado del pelo radical infectado por varias capas de células del córtex que, al ser atravesadas por el cordón de infección, sufren una serie de cambios como son la reordenación de los microtúbulos, la migración del núcleo celular y la formación de una pared celular adicional. Desde el extremo final del cordón de infección y previa hidrólisis del mismo, las bacterias se liberan en el citoplasma de las células vegetales del primordio nodular por un proceso de endocitosis por el que las bacterias quedan rodeadas de una membrana

peribacteroidea que deriva del retículo endoplasmático y del aparato de Golgi de la célula vegetal, quedando así confinadas en una vesícula denominada simbiosoma (Figura 2)

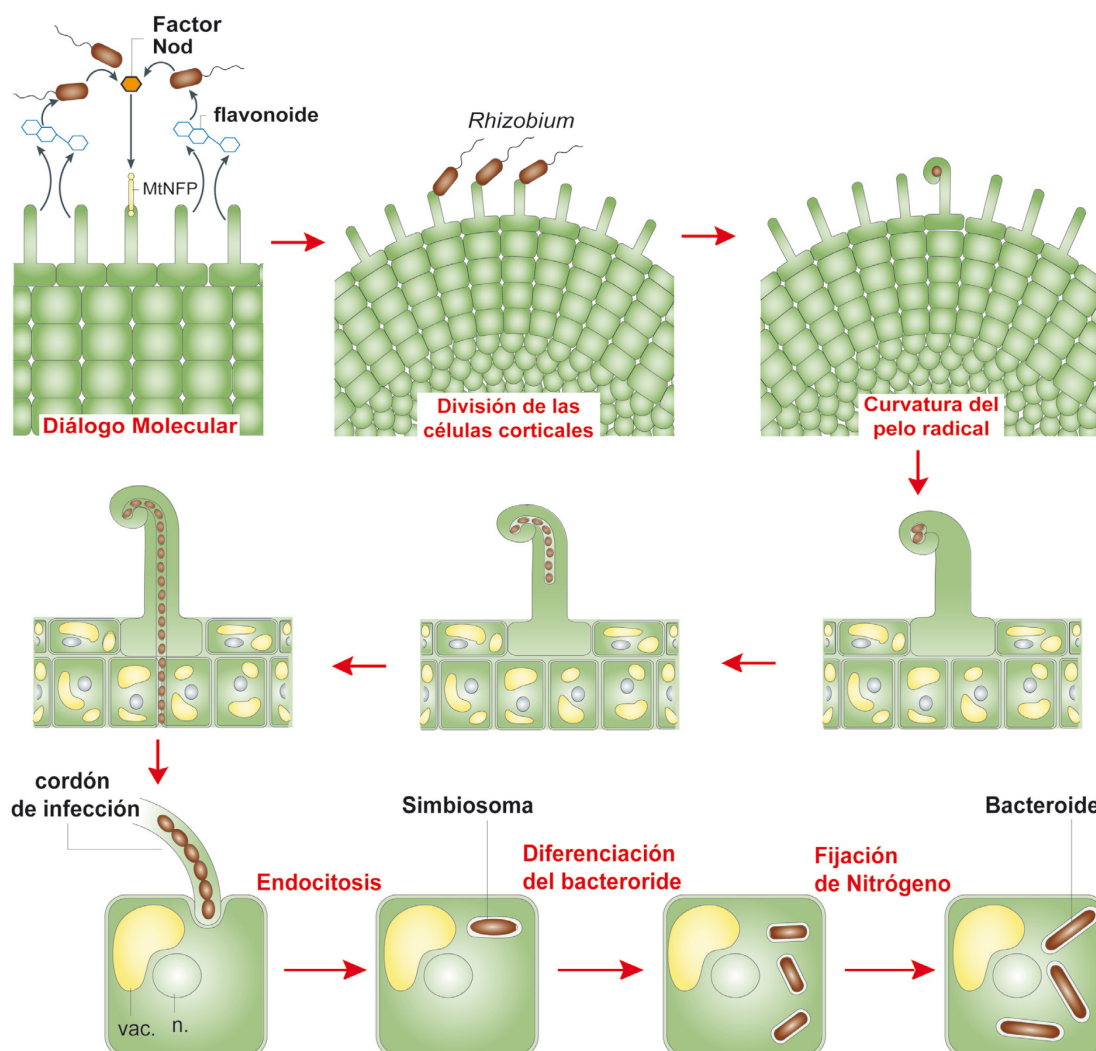


Figura 2. Representación esquemática del proceso de nodulación y formación de los bacteroides. (adaptado de Jones et al. 2007).

Las formas simbióticas intracelulares del microsimbionte reciben el nombre de bacteroides, independientemente de su tamaño, forma o localización. La diferenciación de los bacteroides implica cambios morfológicos, bioquímicos e inducción de la

nitrogenasa. Después de la endocitosis, algunos bacteroides continúan dividiéndose dentro de la membrana peribacteroidea, por lo que, en algunos casos, más de un bacteroide puede estar rodeado por una única membrana. Simultáneamente a la aparición de simbiosomas, el primordio nodular se convierte en nódulo maduro (Figura 2)

En líneas generales, los nódulos contienen dos zonas, una interna o zona de infección y otra externa o córtex. En leguminosas de climas tropicales, como la soja (*Glycine max*) la división de las células del córtex externo da lugar a nódulos de forma esférica o nódulos determinados, en los que la diferenciación de las células infectadas tiene lugar de modo sincrónico. En leguminosas de climas templados, como el trébol (*Trifolium repens*), la división de las células del córtex interno da lugar a nódulos de forma alargada conocidos como nódulos indeterminados.

1.3. Simbiosis fijadoras de N₂

Existen dos grandes grupos de bacterias que forman simbiosis fijadoras de N₂ con plantas superiores, uno formado por las actinobacterias, también llamadas actinomicetos, y el otro compuesto por una serie de bacterias capaces de infectar las raíces, en algunos casos tallos y hojas, de plantas leguminosas, a los que se conoce con el nombre genérico de rizobios.

1.3.1. Simbiosis Frankia-plantas actinorrícicas. Otros actinomicetos

Aunque la fijación simbiótica de N₂ por actinobacterias en simbiosis con plantas no leguminosas se conoce desde 1829, el actinomiceto que forma nódulos en *Alnus* no se identificó hasta 1898. Este endosimbionte pertenece al género *Frankia* y se aisló en cultivo puro en 1978 (Callaham et al. 1978). En la actualidad, se ha aislado de diferentes plantas como *Casuarina*, *Eleagnus*, *Myrica*, etc., aunque en algunos casos, como son los aislados de plantas de *Ceanothus*, no se ha podido reinfectar la planta (Valverde e Igual, 2011).

La clasificación taxonómica basada en la comparación de secuencias del gen 16S rRNA sitúa a *Frankia* como el único género dentro de la familia *Frankiaceae*, que junto a las familias *Acidothermaceae*, *Geodermatophilaceae*, *Cryptosporangiaceae*, *Nakamurellaceae* y *Sporichthyaceae* forman el suborden *Frankineae*, dentro de la subclase *Actinobacteridae* de la clase y filum *Actinobacteria*. El gen 16S rRNA de *Frankia* permite, por otra parte, definir tres grupos de cepas dentro del género *Frankia*

que guardan correspondencia con la especificidad de hospedador. El primero estaría formado por cepas que infectan plantas del orden Fagales, y formarían dos grupos, uno constituido por las cepas que nodulan plantas de las familias *Betulaceae* (*Alnus* sp.) y *Myricaceae*, y el otro por cepas que nodulan exclusivamente a especies de los géneros *Casuarina* y *Allocasuarina* de la familia *Casuarinaceae*. El segundo lo constituyen cepas que nodulan plantas de las familias *Rhamnaceae* y *Rosaceae*, del orden Rosales y cepas de las familias *Coriariaceae* y *Datisceae*, del orden Cucurbitales, que aún no se han aislado en cultivo puro. El tercer grupo está formado por cepas que infectan un amplio rango de plantas con especies en las familias *Elaeagnaceae*, *Rhamnaceae*, *Myricaceae*, *Betulaceae* y *Casuarinaceae* de los órdenes Rosales y Fagales.

Además de *Frankia*, se han aislado otras actinobacterias de raíces y de nódulos de leguminosas que, en la mayoría de los casos pertenecen al género *Micromonospora*. Aunque estas actinobacterias son capaces de fijar N₂ en vida libre se desconoce, hasta la fecha, si son capaces de fijar N₂ en asociación con plantas (para revisión ver Trujillo, 2008; Trujillo et al. 2011).

1.3.2. Simbiosis *Rhizobium*-leguminosa

Las leguminosas (familia *Fabaceae* o *Leguminosae*, orden Fabales) incluyen hierbas perennes o anuales, arbustos y árboles de distribución cosmopolita, fácilmente reconocibles por su flor papilionácea y fruto típico en legumbre. Con aproximadamente 730 géneros y unas 19.400 especies descritas, se distribuye en tres subfamilias: *Cesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*. Por su elevado contenido en proteína, las leguminosas son, después de los cereales, la segunda familia en importancia en la alimentación humana y constituyen la fuente proteica principal para los países en desarrollo. Ello, sin olvidar su relevancia como plantas forrajeras y componentes de piensos para alimentación animal.

Las leguminosas crecen en suelos de escasa fertilidad por lo que se utilizan como plantas pioneras en su recuperación, así como en procesos de revegetación y fitorrecuperación de suelos deteriorados. De manera tradicional se emplean en rotación de cultivos con cereales para mantener la fertilidad del suelo (para revisión ver Carpena et al. 2006; Rodiño et al. 2011).

Las leguminosas son únicas entre los seres vivos ya que, junto con las actinorrícicas, son las únicas plantas superiores, a excepción de *Parasponia*, que tienen la capacidad de formar simbiosis mutualistas fijadoras de N₂ con bacterias diazotrofas. El conocimiento

de la existencia de estos microorganismos data de finales del siglo XIX cuando, por primera vez, Frank en 1889 denominó *Rhizobium leguminosarum* a las bacterias aisladas a partir de nódulos de leguminosas. Fue este nombre el que dio origen al genérico rizobios, para designar a todas las bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. La taxonomía de los rizobios ha sufrido diversos avatares desde su inclusión en 1923 en el Manual de Bergey de Bacteriología Sistemática. En el Manual del año 1974 la clasificación de las bacterias se basó, sobretudo, en la utilización de características fenotípicas y, en el caso de los rizobios, se utilizó su capacidad para nodular como propiedad principal que diferenciaba a los rizobios de otras bacterias del suelo que compartían las mismas características fenotípicas. Este esquema de clasificación desembocó en la definición de grupos de inoculación cruzada, que, en la práctica, fue la base de la diferenciación de especies del género *Rhizobium* en el Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa de los años 1974 y 1984.

En el Manual de 1974, junto al género *Rhizobium* se incluye el género *Agrobacterium* y ambos constituyen la familia *Rhizobiaceae*. En la edición de 1984 se reorganizan las especies de *Rhizobium* debido a criterios basados en los determinantes de patogenicidad y simbiosis, y se adicionan dos nuevos géneros *Bradyrhizobium* y *Phyllobacterium*.

Aunque en 1977 Woese y Fox propusieron un nuevo esquema de clasificación basado en la secuencia del gen *rrn16S* (16S rRNA), este nuevo sistema no se consideró en la edición del Manual de Bergey de Bacteriología Determinativa del año 1994. En este Manual, la diferenciación de las especies seguía basándose en pruebas fenotípicas, aunque se recogen algunos de los grandes cambios ocurridos en la identificación de los rizobios, entre ellos, la descripción de los géneros *Azorhizobium* y *Sinorhizobium* y la inclusión de nuevas especies de *Rhizobium*. A raíz de la propuesta de Woese y Fox, a partir del año 2000, la secuenciación del gen ribosómico 16S rRNA se ha convertido en una exigencia para la descripción de nuevas especies, lo que ha obligado a obtener la secuencia de este gen en todas las especies bacterianas.

La última edición del Manual de Bergey dedicado a las Proteobacterias data del año 2005 y en él la clasificación de las bacterias se basa en los resultados obtenidos a partir de las secuencias del gen ribosómico 16S rRNA. Respecto a los rizobios, en el Manual de 2005 se propone un nuevo orden dentro de la clase alfa de las Proteobacterias, el orden Rhizobiales, que incluye varias familias: a) familia *Rhizobiaceae*, con los antiguos géneros, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium* y *Allorhizobium*; b)

familia *Hyphomicrobiaceae* que contiene un único género, *Azorhizobium*; c) familia *Bradyrhizobiaceae* con el género *Bradyrhizobium*, y d) familia *Phyllobacteriaceae* que incluye los géneros *Mesorhizobium* y *Phyllobacterium*.

Durante estos años se han producido errores en la nomenclatura de los rizobios. Casos de auténtico debate son los de *Ensifer* una bacteria que no nodula leguminosas. Cuando se secuenció el gen 16S rRNA de *E. adhaerens* se observó que esta especie se incluía en el género *Sinorhizobium*, por lo que se debería haber propuesto la reclasificación del género *Sinorhizobium* en el género *Ensifer*. No obstante, se hizo al revés, contraviniendo así las normas de la nomenclatura. También se ha comprobado que la secuencia del gen 16S rRNA de las especies *A. radiobacter* y *A. tumefaciens* era idéntica, por lo que en realidad se trataba de dos cepas de la misma especie, una con el plásmido pTi y otra que carece de él. No obstante, al tratarse de la misma especie hay que nombrarla con el nombre más antiguo que, en este caso, *A. radiobacter*. Otro error se cometió al comprobar que, basándose únicamente en la secuencia del gen ribosómico 16S rRNA, *A. rhizogenes* pertenecía al grupo filogenético de *R. tropici*, ya que provocó la reclasificación del género completo *Agrobacterium* en el género *Rhizobium*. Afortunadamente, a pesar de que ambas especies tienen más del 99% de homología en su gen ribosómico 16S, se ha comprobado que los valores de hibridación de ADN son inferiores al 70% y, por lo tanto, son realmente diferentes especies.

Desde la publicación del último Manual de Bergey se han descrito algunos géneros nuevos en la familia *Rhizobiaceae* así como numerosas especies dentro de los diferentes géneros. En la Tabla 1 se recogen las familias, géneros y especies de rizobios descritas hasta la fecha, correspondiente a 25 de octubre de 2011, por lo que es posible que en el momento de la lectura y defensa de esta Memoria de Doctorado se hayan publicado nuevas especies.

1.4. Otras bacterias, no-rizobios, que forman simbiosis fijadoras de N₂ con leguminosas

Hasta el siglo XXI se consideraba que la simbiosis con leguminosas era una habilidad exclusiva de los rizobios. Sin embargo, en 2001, Moulin et al. describieron dos cepas de *Burkholderia* que se aislaron de nódulos de *Machaerium lunatum* en la Guayana francesa y de *Aspalathus carnosus* en Sudáfrica, siendo éste el primer trabajo sobre la presencia de una Betaproteobacteria en nódulos de leguminosas. Posteriormente, las dos cepas se clasificaron como *B. phymatum* STM815^T y *B. tuberum*

STM678^T, respectivamente (Vandamme et al. 2002). *Burkholderia* se ha aislado posteriormente de nódulos de diversas especies de plantas mimosoideas en Panamá, Costa Rica, Taiwán, Brasil, Venezuela y Madagascar, lo que indica la afinidad de esta especie para establecer simbiosis fijadoras de N₂ con *Mimosa*. Desde 2005 se ha descrito el aislamiento de otras especies de *Burkholderia*, entre ellas, *B. mimosarum*, *B. nodosa* y *B. sabiae*, a partir de nódulos de *Mimosa* spp., la nodulación de *Cyclopia* por *B. tuberum* y la de *Mimosa* por *B. phymatum*. Hoy día se ha establecido con claridad que las especies de *Burkholderia* son más competitivas y mejores simbiosistas de *Mimosa* que otras cepas de rizobios (Elliott et al. 2009; Bontemps et al. 2010; Gyaneshwar et al. 2011). Recientemente se ha demostrado que la capacidad de *B. phymatum* para establecer simbiosis fijadoras de N₂ no se restringe a *Mimosa*, sino que una cepa aislada de *Phaseolus vulgaris* es capaz de nodular efectivamente a *Phaseolus* y a *Mimosa* (Talbi et al. 2010).

Además de fijarlo en simbiosis con leguminosas, la capacidad de reducir N₂ en vida libre también está presente en *Burkholderia*. De las aproximadamente 60 especies clasificadas actualmente dentro del género, 9 son capaces de fijarlo *ex-planta*, lo que se ha demostrado utilizando la técnica de reducción del acetileno a etileno, la presencia del gen *nifH*, que codifica la nitrogenasa reductasa, y, recientemente, mediante experimentos de dilución isotópica de ¹⁵N₂ (Martínez-Aguilar et al. 2008).

También en 2001 se describió la nodulación de diversas especies de *Crotalaria* por *Methylobacterium nodulans* (Jourand et al. 2004), al año siguiente, la de *Neptunia natans* por *Devosia neptuniae* (Rivas et al. 2003) y, en 2002, la de *Aeschynomene indica* por *Blastobacter denitrificans* (van Berkum et al. 2002). En ese mismo año se publicó la nodulación de *Mimosa* por *Ralstonia taiwanensis*, aunque se produjo un error en la clasificación de la bacteria, que fue reclasificada posteriormente como *Cupriavidus taiwanensis*. En 2005 se aislaron otras dos especies, *Phyllobacterium trifolii* y *Ochrobactrum lupini* de nódulos de *Trifolium pratense* y de *Lupinus albus*, respectivamente. Ya en 2007, *O. cytisi*, se aisló de nódulos de *Cytisus scoparius* en España, y en ese mismo año una nueva especie de proteobacteria filogenéticamente cercana a *Methylobacterium* se obtuvo de nódulos de *Lupinus texensis* en Estados Unidos. Una nueva especie, *Shinella kummerowiae* se ha aislado de nódulos de la leguminosa herbácea *Kummerowia stipulacea* en 2008. En la Tabla 2 se recogen las familias, géneros y especies en las que actualmente se clasifican las especies bacterianas que no se incluyen en el orden Rhizobiales, pero que nodulan leguminosas.

1.5. Otros rizobios que no nodulan leguminosas

Algunas bacterias que se han identificado como rizobios son incapaces de nodular leguminosas. Este es el caso de *Bradyrhizobium betae*, que se aisló de tumores de raíces de remolacha (*Beta vulgaris*) cultivadas en el norte de España (Rivas et al. 2004).

1.6. Otros rizobios que no se aislaron de nódulos de leguminosas

Algunos rizobios no se han aislado de nódulos de leguminosas, aunque son capaces de nodularlas. Este es el caso de *Rhizobium daejeonens*, que se aisló de un biorreactor de tratamiento de cianuro, y *R. cellulolyticum*, obtenido a partir de serrín de madera descompuesta de *Populus alba*, pero ambos nodulan a *Medicago sativa*. Otras especies como *R. oryzae* que se aisló de tejidos internos de raíces de plántulas de arroz, pero nodula a *P. vulgaris* y, *G. max.* *R. alamii* especie productora de exopolisacáridos aislada de rizosferas de leguminosas y de no leguminosas, es capaz de nodular a *Medicago ruthenica*.

Para más información sobre la taxonomía de bacterias que nodulan leguminosas se puede consultar las revisiones de Graham (2008) y Rivas et al. 2009, 2011.

Tabla 1. Especies de rizobios válidas actualmente.

Familias						
Rhizobiaceae		Bradyrhizobiaceae	Phyllobacteriaceae		Hyphomicrobiaceae	
Géneros						
Rhizobium	Ensifer	Shinella	Baradyrhizobium	Phyllobacterium	Mesorhizobium	Azorhizobium
Especies						
<i>R. leguminosarum</i>	<i>E. adhaerens</i>	<i>S. kummerowiae</i>	<i>B. japonicum</i>	<i>P. myrsinacearum</i>	<i>M. loti</i>	<i>A. caulinodans</i>
<i>R. phaseoli</i>	<i>E. kummerowiae</i>	<i>S. granuli</i>	<i>B. elkanii</i>	<i>P. trifolii</i>	<i>M. chacoense</i>	<i>A. dobereineriae</i>
<i>R. galegae</i>	<i>E. saheli</i>	<i>S. fusca</i>	<i>B. liaoningense</i>	<i>P. bourgognense</i>	<i>M. huakuii</i>	
<i>R. huautlense</i>	<i>E. medicae</i>	<i>S. yambaruensis</i>	<i>B. yuanmingense</i>	<i>P. brassicacearum</i>	<i>M. ciceri</i>	
<i>R. giardinii</i>	<i>E. meliloti</i>	<i>S. zoogloeoides</i>	<i>B. pachyrhizi</i>	<i>P. caticumbae</i>	<i>M. amorphae</i>	
<i>R. hainanense</i>	<i>E. fredii</i>		<i>B. jicamae</i>	<i>P. ifriqiense</i>	<i>M. mediterraneum</i>	
<i>R. mongolense</i>	<i>E. arboris</i>		<i>B. canariense</i>	<i>P. leguminum</i>	<i>M. plurifarum</i>	
<i>R. gallicum</i>	<i>E. kostiense</i>		<i>B. betae</i>		<i>M. tianshanense</i>	
<i>R. etli</i>	<i>E. terangaie</i>		<i>B. iriomotense</i>		<i>M. albiziae</i>	
<i>R. tropici</i>	<i>E. americanus</i>		<i>B. cytisi</i>		<i>M. caraganae</i>	
<i>R. loessense</i>	<i>E. morelense</i>				<i>M. gobiense</i>	
<i>R. lusitanum</i>	<i>E. abri</i>				<i>M. septentrionale</i>	
<i>R. miluonense</i>	<i>E. garamanticus</i>				<i>M. tarimense</i>	
<i>R. multihospitium</i>	<i>E. indiaense</i>				<i>M. temperatum</i>	
<i>R. oryzae</i>	<i>E. mexicanus</i>				<i>M. thiogangense</i>	
<i>R. pisi</i>	<i>E. nomidicus</i>				<i>M. alhagi</i>	
<i>R. radiobacter</i>	<i>E. sojae</i>				<i>M. australicum</i>	
<i>R. rhizogenes</i>					<i>M. camelthorni</i>	
<i>R. rubi</i>					<i>M. opportunistum</i>	
<i>R. selenitireducens</i>					<i>M. shangrilense</i>	
<i>R. sullae</i>					<i>M. robiniae</i>	
<i>R. tumefaciens</i>					<i>M. metallidurans</i>	
<i>R. yanglingense</i>						
<i>R. undicola</i>						
<i>R. vitis</i>						
<i>R. alamii</i>						
<i>R. cellulosityticum</i>						
<i>R. daejeonense</i>						
<i>R. fabae</i>						
<i>R. indigoferae</i>						
<i>R. larrymoorei</i>						
<i>R. alkalisoli</i>						
<i>R. endophyticum</i>						
<i>R. herbae</i>						
<i>R. mesosinicum</i>						
<i>R. tibiticum</i>						
<i>R. tubonense</i>						

Tabla 2. Géneros y especies de “no-rizobios” que forman nódulos con leguminosas.

Clase	Género	Especie	Leguminosa
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Blastobacter</i>	<i>B. desnitrificans</i>	<i>Aechynomene indica</i>
	<i>Devosia</i>	<i>D. neptuniae</i>	<i>Neptunia natans</i>
	<i>Methylobacterium</i>	<i>M. nodulans</i>	<i>Carolaria glaucooides</i>
			<i>C. perrottetii,</i>
			<i>C. podocarpa</i>
	<i>Ochrobacterium</i>	<i>O. lupini</i>	<i>Lupinus spp.</i>
<i>O. cytisi</i>			<i>Cytisus</i>
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i>	<i>B. mimosarum</i>	<i>Mimosa spp.</i>
		<i>B. nodosa</i>	<i>M. bimucronata</i> y <i>M. scabella</i>
		<i>B. phymatum</i>	<i>Mimosa spp</i> y <i>P. vulgaris</i>
		<i>B. sabiae</i>	<i>M. caesalpinifolia</i>
		<i>B. tuberum</i>	<i>Cyclopia spp.</i>
	<i>Cupriavidus (Ralstonia)</i>	<i>C. taiwanensis</i>	<i>Mimosa</i>

1.7. Mecanismos de protección frente al oxígeno en nódulos de leguminosas.

La nitrogenasa es extremadamente sensible al O₂, lo que se debe, en gran parte, a la sensibilidad del componente I de la enzima por el mismo (Dixon y Kahn, 2004). Por tanto, en el interior de los nódulos, los bacteroides se enfrentan a la paradoja de necesitar oxígeno para respirar y obtener las elevadas concentraciones de ATP que se requieren para el funcionamiento de la nitrogenasa y, por otro lado, proteger a esta enzima de su inactivación cuando las concentraciones intracelulares de O₂ son relativamente altas. Para resolver esta paradoja, los nódulos han desarrollado una serie de mecanismos de manera que la eficiencia energética de la fijación de N₂ sea máxima (Figura. 3).

1.7.1. Barrera de difusión al oxígeno

La determinación de la concentración de oxígeno mediante el uso de microelectrodos demostró su disminución paulatina desde la superficie hacia el interior del nódulo lo que sugería la presencia de una barrera de difusión de oxígeno (BDO) en los nódulos. Posteriormente, la utilización de anticuerpos monoclonales permitió detectar la presencia de oclusiones en los espacios intercelulares de nódulos de soja y lupino debidas a una matriz de glicoproteína especialmente abundante en el córtex medio del nódulo (VandenBosch et al. 1989). Estas oclusiones aumentaban con el incremento de la presión de O₂, y su presencia se confirmó mediante ensayos de inmunoabsorción (ELISA) (Iannetta et al. 1993). Aunque la matriz de glicoproteína es la más estudiada, también se ha demostrado la presencia de lectinas en cacahuete y alfalfa, proteínas ricas en prolina en guisante, isoflavonas dipreniladas en lupino, y otras proteínas ricas en hidroxiprolina en las paredes celulares y en los espacios intercelulares de nódulos de judía (revisado por Minchin, 1997; Minchin et al. 2008). Aparte de la presencia de oclusiones intercelulares, se ha propuesto que la BDO también opera a través de un mecanismo osmótico por el cual se produce un rápido colapso de las células del córtex interno para reducir el tamaño de los espacios intercelulares e incrementar la BDO (revisado por Minchin, 1997 y Minchin et al. 2008). Este fenómeno se ha observado en nódulos de lupino y soja (Iannetta et al. 1995; Serraj et al. 1995). En los sistemas biológicos, el movimiento de agua suele estar asociado al movimiento de iones, de manera que se ha detectado movimiento de iones por medio de microanálisis de rayos X en nódulos de soja congelados (Minchin et al. 1995). Trabajos posteriores han demostrado que cuando los nódulos de soja reciben tratamientos que normalmente

disminuyen la permeabilidad del nódulo se produce un aumento de la razón $[K^+]_{\text{córtez}} : [K^+]_{\text{zona de infección}}$, mientras que tratamientos que aumentan la permeabilidad del nódulo se asocian con una disminución de esta razón (Wei y Layzell, 2006). Por otro lado, muchas enzimas relacionadas con la asimilación de carbono y N, como la anhidrasa carbónica (CA) y la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), se localizan en el córtex interno y en la zona de infección, por lo que varios autores han sugerido que pueden estar implicadas en el funcionamiento de la BDO (revisado por Minchin et al. 2008). Se ha propuesto que el malato producido por la enzima PEPC puede ser un soluto implicado en la osmoregulación y proponen que la CA produciría bicarbonato (HCO_3^-), sustrato necesario para la producción de malato vía PEPC (revisado por Minchin et al. 2008).

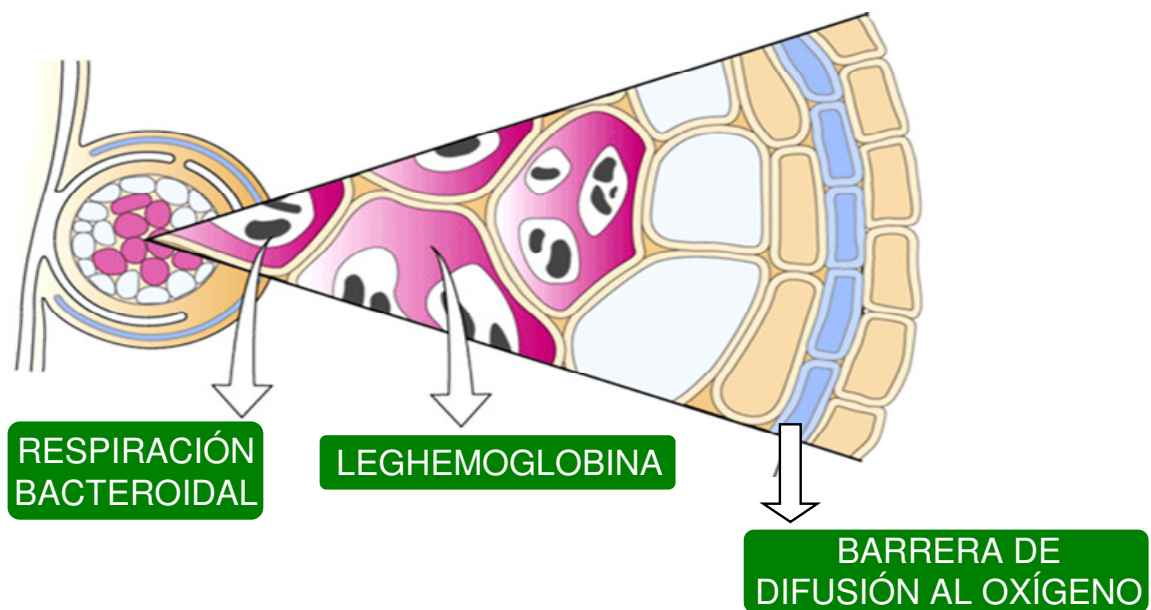


Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de protección frente al oxígeno en nódulos de leguminosas.

1.7.2. Leghemoglobina

La leghemoglobina (Lb) es una hemoproteína monomérica de 16 kDa, constituida por un grupo hemo (protoporfirina IX, un anillo tetrapirrólico que contiene un átomo de Fe) y una globina como apoproteína. Mientras que la globina se sintetiza en los ribosomas de las células infectadas, la procedencia del grupo hemo es todavía objeto de debate.

La Lb es la proteína predominante en los nódulos (~300 μ M), y su concentración puede ser de 2-3 mM en nódulos muy activos. La Lb es esencial para la fijación simbiótica de N₂ puesto que el silenciamiento de su expresión en nódulos de *Lotus japonicus* (por medio de ARN de interferencia, LbRNAi) produce un incremento de la concentración de O₂, la disminución de la razón ATP/ADP, y la ausencia de actividad nitrogenasa en los bacteroides (Ott et al. 2005). Recientemente, un análisis transcriptómico de los nódulos procedentes de las mismas plantas LbRNAi ha revelado que muchos genes, tanto de la bacteria como de la planta, se encuentran regulados de manera diferente en comparación con los nódulos procedentes de las plantas control. Entre éstos, se encuentran los genes *fix* y *nif* de la bacteria responsables de la fijación de N₂ y genes implicados en el metabolismo primario y secundario de la planta (Ott et al. 2009).

La principal función de la Lb es actuar de tampón frente al oxígeno. Su afinidad por el mismo es muy elevada y se une a él de forma reversible. La proteína se oxigena (LbO₂) en el plasmalema y transporta el O₂ hacia el simbiosoma donde tiene lugar su liberación que ocurre, por una parte, debido al gradiente de oxígeno y, por otra, a que la oxidasa terminal del bacteroide tiene más afinidad por el O₂ que la propia Lb (Becana y Klukas, 1992 y Becana et al. 1995).

Los genes que codifican la Lb se inducen en etapas tempranas de la interacción simbiótica, días antes de que comience la fijación de N₂. Esta expresión puede estar relacionada con su función como transportadora de oxígeno o con nuevas funciones desconocidas hasta el momento (Downie, 2005). De hecho, sólo el 20-35% de la Lb presente en el nódulo se encuentra unida al oxígeno (Appleby, 1984; Becana y Klukas, 1992), lo que sugiere que la Lb restante puede estar cumpliendo otras funciones. En este sentido, diversos estudios han demostrado *in vivo* la presencia de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) en nódulos de leguminosas (Meakin et al. 2007; Sanchez et al. 2010). Los complejos LbNO son muy estables de forma que la Lb unida a NO queda inhabilitada para unirse al O₂. Por esta razón, algunos autores han indicado que la

presencia de LbNO puede resultar negativa para la nitrogenasa. Sin embargo, otros han propuesto que la Lb podría actuar como un reservorio de NO, contribuyendo a la protección de la nitrogenasa, que es rápidamente inactivada por el NO y otras especies reactivas de nitrógeno (RNS) (Herold and Puppo, 2005; Sanchez et al. 2010). De hecho, la auto-oxidación de la Lb y otras reacciones enzimáticas que ocurren en los nódulos pueden generar radical superóxido, el cual es capaz de reaccionar con el NO y formar peroxinitrito. En definitiva, existe un riesgo potencial en los nódulos de formar peroxinitrito, que es una RNS capaz de causar la nitración de proteínas. En este sentido, se ha demostrado *in vitro* que la Lb también se puede unir, y desintoxicar, peroxinitrito (Herold and Puppo, 2005).

1.7.3. La oxidasa terminal *cbb₃*

El ATP necesario para la reducción del N₂ por la nitrogenasa se obtiene mediante la oxidación de los ácidos orgánicos procedentes de la planta hospedadora. No obstante, ambos mecanismos, la barrera de difusión al oxígeno y la presencia de la Lb, hacen que la concentración de O₂ en el interior del nódulo sea extremadamente baja, de 3 a 22 nM (Witty y Minchin, 1990; Hunt y Layzell, 1993). A diferencia del sistema respiratorio mitocondrial eucariótico, que consta de una única oxidasa terminal, las especies bacterianas se caracterizan por poseer múltiples cadenas respiratorias cuyas oxidasas terminales presentan distinta afinidad por el O₂. Esta propiedad permite a las bacterias adaptar con eficacia la fosforilación oxidativa a las variaciones de las condiciones medioambientales que pueden ocurrir en su hábitat natural (Delgado et al. 1998).

La existencia de una oxidasa terminal de elevada afinidad por el oxígeno se demostró por primera vez en bacteroides de *B. japonicum*. Se trata de la citocromo *c* oxidasa de hemo-cobre *cbb₃*, cuya afinidad por el oxígeno es del orden de 7 nM (Preisig et al. 1996a). La enzima está formada por 4 subunidades, FixNOQP, de las que FixN es la subunidad catalítica, está asociada a la membrana y su tamaño molecular es de 16 kDa. Otras dos subunidades, FixO y FixP, son citocromos *c* de 27 y 31 kDa, respectivamente. Fix P facilita el transporte de electrones entre el complejo *bc₁* y el núcleo estructural de la oxidasa formado por la subunidades FixN-FixO. FixQ es una proteína de 6 kDa que no parece esencial ni para el ensamblaje ni para la función de la enzima (Preisig et al. 1993, 1996; Zufferey et al. 1996, 1998). Estudios recientes han establecido la contribución de las proteínas CoxG y ScoI de *B. japonicum* en la biogénesis de la oxidasa *cbb₃* (Bühler et al. 2010). Estas proteínas son homólogas a Cox11 y Sco1 de la

mitocondria las cuales están implicadas en la formación de los centros Cu_B y Cu_A de la oxidasa *aa*₃ mitocondrial. El análisis del fenotipo de mutantes *coxG* y *scoI* de *B. japonicum* demostró que el proceso de biogénesis de la oxidasa *cbb*₃ de *B. japonicum* es diferente al de la oxidasa *aa*₃ de las mitocondrias (Bühler et al. 2010).

La oxidasa terminal *cbb*₃ de *B. japonicum* está codificada por el operón *fixNOQP*. Cepas de esa bacteria defectivas en cualquiera de los genes *fixN*, *fixO* o *fixP* son incapaces de fijar N₂ (Preisig et al. 1993). No obstante, una mutante en el gen *fixQ* es efectiva en simbiosis con soja, por lo que FixQ no es esencial para la formación del complejo (Zufferey et al. 1996). Además, se ha comprobado que el complejo *bc*₁, codificado por los genes *fbcFH*, es un componente esencial de la cadena respiratoria de *B. japonicum* ya que sería el responsable de ceder los electrones a la oxidasa *cbb*₃.

Por otra parte, se ha comprobado que las proteínas codificadas por los genes *fixGHIS*, operón que se localiza a continuación del *fixNOQP*, son necesarias para la síntesis de la oxidasa terminal *cbb*₃ (Kahn et al. 1989; Preisig et al. 1996b). Mediante experimentos de transcripción *in vitro* se ha demostrado que la proteína FixK₂ es el activador transcripcional de la expresión de los genes *fixNOQP* de *B. japonicum* en respuesta a condiciones limitantes de oxígeno (Mesa et al. 2005). Dicho regulador forma parte de la cascada reguladora FixLJ-FixK₂ de *B. japonicum*. Estudios recientes han propuesto que la expresión de los genes *fixNOQP* de *B. japonicum* en condiciones desnitrificantes depende del estado redox de la célula además de la concentración de oxígeno (Bueno et al. 2009).

Sinorhizobium metiloti, el microsimbionte de alfalfa, posee tres copias de los genes *fixNOQP* los cuales se expresan en microaerobiosis y en los bacteroides (Becker et al. 2004). Sin embargo, se desconoce su papel en la fijación simbiótica de N₂. *R. leguminosarum* *bv. viciae* poseen dos copias del operón *fixNOQP*, y ambas se requieren para la óptima fijación de N₂ (Shlüter et al. 1997). Aunque *R. etli* CFN42 también posee dos copias del operón *fixNOQP* (*fixNOQPd* y *fixNOQPf*), sólo la primera se requiere para la formación de una simbiosis eficaz (Girard et al. 2000). El operón *fixNOQPd* se induce en condiciones limitantes de oxígeno y su expresión está controlada, al menos, por tres reguladores transcripcionales, FixKf y FnrNd localizados en el plásmido pSym, y FnrNchr localizado en el cromosoma (Girard et al. 2000). Posteriormente, Granados-Baeza et al. (2007) demostraron que, en microaerobiosis, tanto el operon *fixNOQP* como el gen *fixKf* están reprimidos por dos reguladores transcripcionales de la familia Crp/Fnr denominados StoRd y StoRf. La inactivación de cualquiera de los genes *stoRd*

y *StoRf* aumenta la expresión de las dos copias del operón *fixNOQP*, lo que resulta, a su vez, en el incremento de la expresión de la oxidasa terminal *cbb₃* en los bacteroides de los nódulos de *P. vulgaris*. A pesar de su homología, ambos genes cumplen funciones diferentes ya que una mutante en *storRd*, pero no en *stoRf*, mejoró tanto la expresión de *fixKf* como la capacidad de *R. etli* CFN42 para fijar nitrógeno en simbiosis con plantas de judía (Granados-Baeza et al. 2007).

1.8. Estrés abióticos y fijación simbiótica de N₂

La fijación simbiótica de N₂ es un proceso sensible a condiciones ambientales adversas, entre ellas el déficit hídrico o sequía (Zahran, 1999, Sprent. 2001; Aresse-Igor et al. 2011), salinidad (Delgado et al. 1993; Cordovilla et al. 1994; Zahran, 1999), temperaturas extremas (Prasad et al. 1994; Nayyar et al. 2005), metales pesados (Sandalio et al. 2001), etc., que provocan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que reducen la capacidad de fijar N₂. Las estrategias para obtener tolerancia a estrés abióticos en leguminosas implican un sistema de alta complejidad en el que no sólo hay que considerar la planta, sino también al microsimbionte, y a la capacidad de fijación de nitrógeno por los nódulos, mecanismos que se ven afectados por condiciones de salinidad o déficit hídrico antes y de forma más severa que el proceso fotosintético (Djekoun and Planchon, 1991).

1.8.1. Sequía y fijación de nitrógeno por los nódulos

Al estar la fijación de N₂ restringida a las simbiosis rizobio-leguminosa y *Frankia*-plantas actinorrizas, son escasas las revisiones que contemplan el efecto de la sequía sobre la fijación biológica de nitrógeno (FBN) en nódulos de leguminosas (Serraj et al. 1999a; Serraj, 2002, 2003; Zahran, 1999; Schulze, 2004; Purcell, 2009; Arrese-Igor et al. 2011). Hay que indicar, no obstante, que la mayoría de las respuestas de las leguminosas a la sequía son similares a las de las especies de otras familias de plantas. Aquí nos centremos en describir el efecto de la sequía sobre la FBN por los nódulos de las leguminosas.

Hay que tener en cuenta que el efecto negativo de la sequía sobre la FBN es la suma del efecto sobre: a) el proceso infección, b) el crecimiento y desarrollo del nódulo y, c) el funcionamiento del nódulo. Se ha propuesto que la disminución de la capacidad fijadora de N₂ de los nódulos provocada por la sequía es consecuencia de una serie de mecanismos fisiológicos que afectan a la actividad nitrogenasa, entre los que caben

destacar: (i) cierre de la barrera de difusión al oxígeno, provocando una disminución en la concentración de oxígeno disponible para la respiración bacteroidal, (ii) disminución de sustratos carbonados a los bacteroides y (iii) la inhibición de la actividad nitrogenasa provocada por la acumulación de compuestos nitrogenados (revisado por Serraj et al. 1999a; Serraj, 2002; 2003, Schulze, 2004; Purcell, 2009; Arrese-Igor et al. 1999; 2011).

1.8.1.1. Efecto en el flujo de oxígeno al nódulo

En términos generales, una de las respuestas de los nódulos a un estrés ambiental tal como la sequía o salinidad consiste en el cierre de la BDO lo que limita el suministro de O₂ a los bacteroides para la respiración y obtención del ATP necesario para satisfacer las demandas energéticas de la enzima nitrogenasa (revisado por Minchin et al. 2008, Arrese-Igor et al. 2011). En este sentido, se ha demostrado en las simbiosis *Medicago truncatula*-*S. meliloti* (Aydi et al. 2004) y *Cicer arietinum*-*Mesorhizobium ciceri* (L'taief et al. 2007) que la tolerancia de las plantas a la salinidad está asociada con un incremento en la permeabilidad o conductancia de oxígeno en los nódulos la cual contribuye a incrementar la respiración de oxígeno en los nódulos. Experimentos realizados en plantas de guisante demostraron que el tratamiento de las mismas con ClNa redujo la capacidad respiratoria de los bacteroides (Delgado et al. 2003). Estos resultados sugieren la existencia de una interacción entre salinidad y capacidad respiratoria de los nódulos y los bacteroides por lo que una posible estrategia a abordar para mejorar la tolerancia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa a la sequía o salinidad consistiría en la inoculación de la leguminosa con cepas de rizobios con mayor capacidad respiratoria. De hecho, se ha demostrado que cepas mutantes de *Rhizobium tropici* y *Rhizobium etli* con una mayor capacidad respiratoria presentan una mayor eficiencia para fijar nitrógeno en simbiosis con plantas de judía (Marroquí et al. 2001; Silvente et al. 2002, Granados-Baeza et al. 2007).

Si el cierre de la barrera fuese el único factor causante de la disminución de la fijación, entonces la inhibición sería reversible al aumentar la disponibilidad externa de O₂. Sin embargo, Hunt y Layzell (1993) y Díaz del Castillo et al. (1994) demostraron que la reducción de N₂ no se restauraba al incrementar la concentración de O₂ alrededor de los nódulos. Por lo tanto, aunque es evidente que una disminución en el flujo de oxígeno hacia el interior de los nódulos es fundamental en la respuesta de los mismos a

las circunstancias ambientales desfavorables, deben existir otras limitaciones metabólicas implicadas en esta respuesta.

1.8.1.2. Efecto en el metabolismo carbonado de los nódulos

La energía que se requiere para la actividad de la enzima nitrogenasa deriva del metabolismo de los compuestos que se producen durante la fotosíntesis de la planta hospedadora. Tales productos, de los que la sacarosa es el más abundante, se transportan a los nódulos, donde se utilizarán para incorporar el amonio producido durante la fijación de N_2 (revisado por González et al. 2006).

La sacarosa se metaboliza en el citoplasma de las células infectadas por la enzima sacarosa sintasa (SS) que rompe su enlace glucosídico dando lugar a UDP-glucosa y fructosa (Thummler y Verma, 1987). La hidrólisis de la sacarosa en el nódulo también se puede llevar a cabo por la invertasa alcalina, lo que dará lugar a la formación de glucosa y fructosa que pueden fosforilizarse en presencia de ATP (Figura 4).

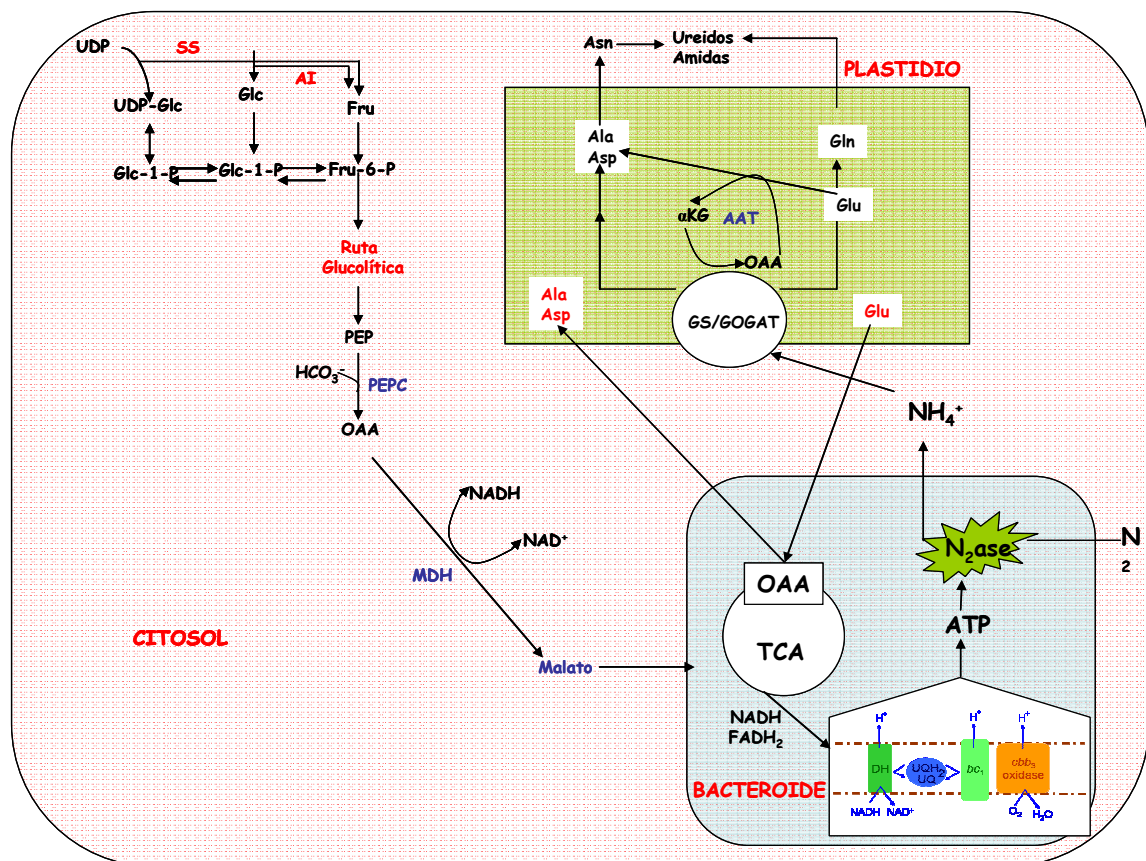


Figura 4. Esquema representativo de las principales rutas metabólicas en los nódulos de leguminosas. (adaptado de Lodwig et al. 2003 y Naya et al. 2007)

La SS puede dar lugar a la formación de hexosas fosfato que dirigirán el flujo de carbono hacia la ruta glucolítica ya que pueden reaccionar con pirofosfato para producir glucosa-1-fosfato y UTP mediante la acción de la enzima UDP-glucosa pirofosforilasa. Esta enzima, junto con la glucosa-6-fosfato, produce fosfoenolpiruvato (PEP) que se metaboliza por la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC) en oxalacetato que, a su vez, se convierte en malato por la enzima malato deshidrogenasa (MDH) (Figura 4). Los ácidos dicarboxílicos se transportan a través de la membrana peribacteroidea desde el citosol de la célula vegetal al simbiosoma donde constituyen la principal fuente de C para los bacteroides. El malato es el ácido orgánico más abundante en los nódulos y el sustrato preferente para el funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (revisado por González et al. 2006). En los bacteroides el malato es oxidado por la malato deshidrogenasa a oxalacetato o descarboxilado a piruvato por la NAD^+ -enzima málico (White et al. 2007). El piruvato es convertido a acetyl coenzima A (acetyl-CoA) por la piruvato deshidrogenasa y metabolizado en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (White et al. 2007). Estudios recientes han demostrado en nódulos de guisante que existen dos rutas de síntesis de piruvato; la catalizada por la enzima NAD^+ -enzima málico y la catalizada por las enzimas PEP carboxiquinasa (PckA)/piruvato quinasa (PykA) (Mulley et al. 2010).

Estudios realizados en nódulos de soja (González et al. 1995), guisante (González et al. 1998) y judía (Ramos et al. 1999) han demostrado una severa inhibición de la SS como respuesta temprana a la sequía, a la que seguía un descenso del flujo glucolítico y una disminución de los ácidos orgánicos tales como el malato (Gálvez et al. 2005, Ladrera et al. 2007) necesarios para, tras su metabolización en los bacteroides, producir la energía necesaria para mantener la fijación de N_2 (revisado por Arrese-Igor, 1999; 2011). La utilización de mutantes de *M. truncatula* (Bair et al. 2007) y *Lotus japonicus* (Horst et al. 2007) alteradas en la actividad sacarosa sintasa, validó la función de esta enzima en el correcto funcionamiento de la fijación de N_2 .

La falta de malato en condiciones de sequía también podría deberse a la incapacidad del HCO_3^- para unirse al PEP para formar oxalacetato y, posteriormente, malato. Aunque tanto la anhidrasa carbónica como la PEPC son esenciales para el funcionamiento de los nódulos, no se ha demostrado que su actividad esté afectada o desempeñen alguna función esencial en la respuesta a sequía (Coba de la Peña et al. 1997; Gálvez, 2000).

Una evidencia adicional que relaciona el metabolismo del C con la respuesta a la sequía en nódulos se obtuvo al comprobar que las variedades que muestran distinta tolerancia a la sequía también presentan respuestas diferentes en su actividad sacarosa sintasa tanto en soja (Ladrera et al. 2007) como en judía (Sassi et al. 2008). El análisis proteómico de los nódulos de *M. truncatula* confirmó la implicación de la SS como la enzima clave en la respuesta de los nódulos a la sequía (Larraínzar et al. 2007).

La inhibición del catabolismo de la sacarosa en nódulos en coincidencia con un flujo sostenido de la misma desde el tallo resultaría en la acumulación de sacarosa en los nódulos. Aunque estas concentraciones no son lo suficientemente elevadas para garantizar un adecuado ajuste osmótico, pueden ser suficientes para proporcionar una cierta osmoprotección contra el daño producido por las especies reactivas de oxígeno sobre proteínas y membranas celulares (Cuin y Shabala, 2005, 2007).

Recientemente se ha demostrado en alfalfa que la exposición de la planta a una sequía moderada causa una disminución de la actividad y expresión de la nitrogenasa y activa la transcripción de la mayoría de los genes que codifican enzimas relacionadas con la defensa antioxidante. Sin embargo, una sequía moderada no tiene efecto en la actividad SS de los nódulos (Naya et al. 2007). Aunque un déficit hídrico más acusado produjo una disminución de la actividad SS, sin embargo no disminuyó el contenido en malato, succinato y sacarosa de los nódulos. Estos resultados sugieren que en plantas de alfalfa, la capacidad metabólica de los bacteroides y el daño oxidativo de los componentes celulares son los principales factores que contribuyen a la inhibición de la fijación de N₂ inducida por la sequía (Naya et al. 2007). Aunque el estudio proteómico de la respuesta de *M. truncatula* a la sequía puso de manifiesto que la inhibición de la SS es uno de los cambios más notables en los nódulos (Larraínzar et al. 2007), el análisis combinado del proteoma y del metaboloma de los nódulos de estas plantas mostró que el contenido en SS no se correlaciona con una disminución de la concentración de malato (Larraínzar et al. 2009), tal como se había descrito para las leguminosas grano (Gálvez et al. 2005, Ladrera et al. 2007). Este diferente comportamiento de las especies del género *Medicago* frente a otras especies de leguminosas permite especular con la posibilidad de que, en los nódulos de las leguminosas forrajeras, el papel del control por nitrógeno o la sensibilidad de los bacteroides a estas condiciones desempeñen una función más relevante que en las leguminosas grano estudiadas hasta el momento.

1.8.1.3. Efecto en el metabolismo nitrogenado del nódulo

En el citosol de las células infectadas del nódulo, la actividad conjunta de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (glutamina oxoglutarato aminotransferasa, GOGAT) dan lugar a la formación de glutamina como primer producto orgánico nitrogenado que se origina a raíz de la fijación de N_2 . Cuando la concentración de amonio en el citosol es abundante la glutamato deshidrogenasa (GDH), que no requiere ATP, puede catalizar la incorporación del amonio a oxalacetato para formar glutamato (revisado por González et al. 2006). A partir de la glutamina tiene lugar la síntesis del resto de compuestos nitrogenados, amidas (glutamina y asparagina) y ureidos (alantoína y ácido alantoico) característicos de las leguminosas de origen templado y tropical, respectivamente (Figura 4). La GS cataliza la síntesis de glutamina a partir de amonio y glutamato consumiendo una molécula de ATP. La GOGAT transfiere el grupo amida de la glutamina al 2-oxoglutarato generando dos moléculas de glutamato. De ellas, una se utiliza para incorporar amonio, mientras que la otra se transfiere al xilema para su utilización por la planta. Amidas y ureidos se consideran compuestos para el transporte del N a los lugares donde se necesitan para el crecimiento de la planta. Recientes trabajos han demostrado que no sólo ocurre un transporte de N desde el microsimbionte a la planta sino que el transporte de aminoácidos desde la planta al bacteroide es también necesario para que tenga lugar la fijación de N_2 en nódulos de guisante (Lodwig et al. 2003; Purcell et al. 2009). Con el objeto de investigar la implicación de la asimilación de amonio por los bacteroides en la fijación de N_2 , se han llevado a cabo análisis fenotípicos de cepas de *R. leguminosarum* mutadas en los genes que codifican las enzimas GS/GOGAT y alanina deshidrogenasa (Mulley et al. 2011). Los resultados obtenidos demostraron que una mutación en los genes responsables de la enzima GOGAT inhibió la formación de los bacteroides y la fijación de N_2 probablemente debido a la incapacidad de estas mutantes de sintetizar o transportar aminoácidos. Estos autores proponen que la síntesis de aminoácidos *de novo* en los bacteroides no es necesaria dado que los suministrados por la planta es suficiente para mantener la fijación de nitrógeno (Mulley et al. 2011).

La óptima funcionalidad de las relaciones entre el metabolismo del C y del N en los nódulos puede alterarse por aquellas condiciones ambientales que determinen una drástica reducción de la actividad fijadora de N_2 .

Estudios previos llevados a cabo usando fertilizantes nitrogenados sugirieron que el estado nitrogenado de la planta podría regular la fijación de N_2 (Streeter, 1988; Parsons

et al. 1993; Hartwig, 1998). Se propuso entonces que la inhibición por retroalimentación podría estar implicada en la regulación de la FBN en condiciones de sequía, y se presentaron varios compuestos como candidatos responsables de la inhibición (King y Purcell, 2005).

De hecho, el análisis del contenido en ureidos en el tallo de plantas de soja demostró que la acumulación de ureidos se correlacionaba con la disminución de la fijación de N_2 por sequía (King y Purcell, 2005). Mediante el uso de cultivares de soja sensibles y tolerantes a la sequía se ha confirmado la correlación entre la acumulación de ureidos en los nódulos y la disminución de la fijación de N_2 por sequía (Ladrera et al. 2007). Sin embargo, estos autores observaron que una sequia leve no afectó a la acumulación de ureidos en las hojas de las variedades sensibles y tolerantes, a pesar de que se produjo una inhibición de la fijación de N_2 (Ladrera et al. 2007). Estos resultados sugieren que los ureidos de las hojas no son responsables de la inhibición de la fijación de N_2 en las primeras etapas de la sequía, aunque no se puede descartar que tengan un papel importante en sus estadios finales. Se puede concluir, por tanto, que los ureidos de los nódulos, junto con otros compuestos nitrogenados, son potenciales candidatos para inducir una inhibición por retroalimentación de la fijación de N_2 (Serraj et al. 1999b, Serraj, 2002, 2003). Estudios recientes en *P. vulgaris* han propuesto que la acumulación de ureidos en respuesta a un déficit hídrico es independiente de la síntesis *de novo* de ureidos en los nódulos (Alamillo et al. 2010). Además, la expresión de la enzima clave de la degradación de ureidos en el tallo, la alantoato amidohidrolasa, es independiente de la tolerancia a sequía en plantas de soja (Charlson et al. 2009). Por todo ello, en la actualidad no está claro que los ureidos sean los compuestos nitrogenados implicados en el descenso de la fijación de N_2 en respuesta a la sequía. De hecho, como sugirió Sprent (2001), es poco probable que los ureidos cumplan esta función ya que su presencia se limita a los nódulos de unas pocas subfamilias de leguminosas. Esto lleva, de nuevo, a la pregunta sobre cuál podría ser la molécula señal que explicara la existencia del mecanismo de retroalimentación por N en condiciones de sequía.

En los nódulos existe un intercambio de carbono (en forma de malato), desde el citosol de la célula vegetal, y de NH_4^+ , producido por los bacteroides, a través de las membranas del simbiosoma y de los bacteroides (revisado por White et al. 2007). En este modelo es difícil estimar cómo el estado nitrogenado de la planta puede tener un efecto directo sobre la actividad nitrogenasa. No obstante, se ha propuesto que, como consecuencia de la sequía, el intercambio de aminoácidos entre ambos componentes de

la simbiosis podría afectarse por la acumulación de compuestos nitrogenados, siendo posible así una regulación por nitrógeno (Lodwig et al. 2003).

1.8.1.4. Respuesta de los nódulos a la sequía

Las señales que intervienen en la respuesta de los nódulos a un déficit hídrico pueden producirse en el nódulo o provenir de una comunicación sistémica en la planta. La inhibición de la fijación por sequía mediada por la SS no implica señales sistémicas, como el ácido abscísico (ABA) (González et al. 2001), sino que, mediante el empleo de semirraíces, se ha demostrado que se trata de una regulación local (Marino et al. 2007). Aunque el ABA no parece estar implicado en la inhibición de la SS en respuesta a sequía, el aumento de las concentraciones de ABA disminuyó la fijación de N₂ a través de la concentración/funcionalidad de la leghemoglobina (González et al. 2001a).

Se ha propuesto que las especies reactivas de oxígeno (ROS) desempeñan una función crucial en la regulación redox que se produce durante la sequía, afectando la expresión de la SS tanto a nivel transcripcional como post-traduccional (Marino et al. 2008). De hecho, las respuestas fisiológicas de los nódulos a la sequía pueden mimetizarse mediante la aplicación local de un generador de ROS, como el paraquat (Marino et al. 2006). Actualmente, se acepta sin discusión el papel de las señales redox en el establecimiento y mantenimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa (Marino et al. 2009; Chang et al. 2009). La leghemoglobina también puede ser objeto de regulación redox a concentraciones de ROS superiores a las que se requieren para afectar a la sacarosa sintasa (Marino et al. 2006). Es importante considerar que la señalización oxidativa debe ocurrir en los nódulos antes que se produzca algún daño oxidativo a las proteínas o los lípidos.

Aunque durante bastante tiempo se ha asumido que las señales implicadas en la percepción y respuesta a la sequía se producían en la fracción vegetal de los nódulos, resultados recientes en alfalfa sugieren que la capacidad metabólica de los bacteroides y el daño oxidativo de los componentes celulares son factores que contribuyen a la inhibición de la FBN inducida por la sequía (Larrainzar et al. 2009).

1.8.2. Estrés salino, osmoadaptación y solutos compatibles en rizobios

Recientes estimaciones consideran que el 40% de la superficie mundial está afectada por la salinidad (FAO, 2005; Evelin et al. 2009; Jadhav et al. 2010). La mayoría de estas regiones se localizan en las áreas áridas y semiáridas del planeta dónde las temperaturas son relativamente elevadas, lo que provoca una fuerte evapotranspiración que supera las precipitaciones anuales, y dónde el riego es necesario para satisfacer las exigencias en agua de los cultivos. No obstante, los suelos afectados por la sal se encuentran en casi todas las regiones climáticas, desde los trópicos a los polos, y a diferentes altitudes, tanto bajo el nivel del mar, como es el caso del Mar Muerto, como en montañas de más de 5.000 m de altura como ocurre en las Montañas Rocosas o en la Meseta Tibetana. Causas naturales como la erosión de rocas ricas en cloruros, carbonatos y sulfatos de sodio, calcio y magnesio originan la salinización de los suelos (Odeh y Onus, 2008). La fertilización y la irrigación con aguas de elevado contenido iónico originan una salinización secundaria de los suelos que agrava el problema. Además, la mayoría de las especies vegetales no están adaptadas a las condiciones salinas, lo que representa una seria limitación del rendimiento de los cultivos agrícolas (Hu y Schmidhalter, 2002; Rengasamy, 2006; Munns y Tester, 2008).

En condiciones salinas, el estrés que sufren las plantas es doble, uno originado por el incremento del potencial osmótico en el medio como resultado de la elevada concentración de solutos, y otro ocasionado por el efecto tóxico debido a la elevada concentración iónica (Demir y Kocakalican, 2002). La sal en la solución del suelo reduce la capacidad de las plantas para tomar agua, efecto osmótico que disminuye el turgor de las células y, en consecuencia, su crecimiento (Munns, 2002, 2005). El estrés salino afecta muchos otros aspectos del metabolismo de las plantas entre ellos la fotosíntesis, la respiración, la incorporación de minerales del suelo, etc., lo que lleva aparejado una disminución del crecimiento vegetal (Tuteja, 2007; Manchanda y Garg, 2008).

En el caso de las leguminosas se sabe que son sensibles a la sal, y que este efecto es mayor en plantas que crecen dependiendo de la simbiosis con rizobios ya que, además de la planta, la bacteria puede ser sensible a la sal tanto en vida libre como en simbiosis (Läuchli, 1984; Zhou et al. 1992; Zahran, 1999). En la asociación rizobio-leguminosa, la planta es, en general, más sensible al estrés salino que el microsimbionte sólo ya que la concentración de sal que inhibe el desarrollo de planta es, generalmente, menor que la que impide el crecimiento del microsimbionte (Zahran, 1999; Bordeleau y Prévost,

1994). De hecho, se han descrito cepas de *S. meliloti* que toleran hasta 300 mM de NaCl en vida libre, mientras que 100 mM de sal inhibe la nodulación y la fijación de N₂ en la simbiosis *S. meliloti*-*M. sativa* (Graham y Vance, 2000). Igualmente, *R. tropici* CIAT899 crece en presencia de 250 mM de NaCl en estado libre, pero 50 mM de sal impide el establecimiento de la simbiosis con *P. vulgaris* (Bouhmouch et al. 2005).

Aunque los rizobios muestran una marcada variación en su resistencia a la sal, no está claro que las cepas resistentes sean mejores fijadoras de N₂ que las cepas sensibles en condiciones salinas. Diversos trabajos han demostrado que las cepas tolerantes son simbióticamente más eficientes que las cepas sensibles. No obstante, se ha argumentado que tales diferencias podrían deberse a variaciones genotípicas no relacionadas con la tolerancia a la sal (Zahran, 1999). En realidad, apenas se han empleado líneas isogénicas en los estudios que tratan de relacionar la tolerancia a la sal y la efectividad simbiótica. En cualquier caso, el empleo de cepas tolerantes parece aliviar el efecto del estrés sobre el crecimiento de las leguminosas (Nogales et al. 2002; Tejera et al. 2004; Miller-Williams et al. 2006; Mnasri et al. 2007; Ben Rhomdhane et al. 2007; Mhadhbi et al. 2008, 2009; Domínguez-Ferreras et al. 2009a, Mhadhbi et al. 2011).

La salinidad afecta el proceso de infección porque disminuye la supervivencia de los rizobios en el suelo, reduce el crecimiento de la raíz e inhibe la formación de cordones de infección, lo que resulta en la disminución del número de nódulos que se forman (Tu, 1981; Zahran and Sprent, 1986; Zahran, 1999; Bouhmouche et al. 2005). El exceso de sal, por otra parte, disminuye la capacidad de fijar N₂ y, por ello, el contenido en N de las plantas (Delgado et al. 1993, 1994; Baker et al. 1995; Shamseldin y Werner, 2005, Aydi et al. 2008).

El término osmoadaptación describe las manifestaciones fisiológicas y genéticas de la adaptación a ambientes con variaciones en la disponibilidad de agua (Galinski, 1995). Osmoadaptación en procariotas es la respuesta adaptativa que se produce como consecuencia de una situación de déficit hídrico causado por el aumento en la salinidad externa o por la presencia de elevadas concentraciones de azúcares en el medio externo. Las células vivas han desarrollado dos tipos de estrategias para mantener el turgor celular y evitar la pérdida de agua ocasionada por el incremento de la osmolaridad en el medio. Por una parte, la modificación de fosfolípidos y ácidos grasos de sus membranas celulares y, por otra, la acumulación intracelular de grandes cantidades de iones u otros osmolitos para compensar el estrés osmótico externo (Oren, 1999; Galinski, 1995). La acumulación de iones inorgánicos, principalmente potasio y cloro, hasta niveles

citoplasmáticos similares a los extracelulares es un mecanismo propio de bacterias halófilas extremas, requiere adaptaciones estructurales y constituye una fase inicial del proceso de osmoadaptación (Sleator y Hill 2001). En la mayoría de las eubacterias, actinomicetos, algas, hongos y levaduras, dado que elevadas concentraciones intracelulares de K^+ tienen efectos negativos sobre las funciones celulares, su captación es una respuesta inadecuada para la adaptación a elevada salinidad durante periodos prolongados. Transcurrido un tiempo desde que se inició el estrés, en la mayoría de las eubacterias, actinomicetos, algas, hongos y levaduras es necesaria una segunda fase en la que la osmoadaptación depende de osmolitos orgánicos solubles y de bajo peso molecular, denominados solutos compatibles. La acumulación de estos compuestos, ya sea mediante transporte desde el exterior o mediante síntesis *de novo*, no interfiere en el desarrollo de los procesos celulares vitales (Brown, 1976; Galinski 1995; Da Costa et al. 1998; Wood et al. 2001). Esta estrategia es muy flexible y permite a los organismos adaptarse a fluctuaciones significativas de la osmolaridad del medio. El espectro de solutos compatibles incluye azúcares (sacarosa, trehalosa), polioles (sorbitol, manitol) aminoácidos libres (prolina, glutamato, glutamina), betaínas y ectoínas, etc. (Da Costa et al. 1998). La mayoría de los organismos no utilizan un único compuesto sino que, en respuesta a un estrés hiperosmótico, acumulan una serie de solutos compatibles cuya composición depende del organismo, de la fase de crecimiento, de las condiciones fisiológicas de la célula y de la composición del medio de cultivo (Galinsky y Trüper, 1994).

Además de su papel osmoprotector, los solutos compatibles pueden cumplir otras funciones. Así, su capacidad para acumularse hasta concentraciones elevadas les permite ser importantes reservas de carbono o nitrógeno, actuado como un sistema de almacenamiento de nutrientes y energía. Muchos solutos compatibles son estabilizadores enzimáticos y proporcionan protección no sólo frente a elevadas concentraciones de sal, sino también a altas temperaturas, ciclos de congelación y descongelación o desecación y estrés oxidativo (Welsh, 2000; Santos et al. 2002).

La mayoría de los estudios sobre osmoadaptación y solutos compatibles en rizobios se han llevado a cabo utilizando *S. meliloti*, en donde la respuesta primaria al estrés hiperosmótico es la acumulación de potasio y glutamato (Bosford y Lewis, 1990). De las 4 sistemas implicados en el transporte de potasio descritos en *S. meliloti*, Trk es el más importante (Domínguez-Ferreras et al. 2009a). También es conocida la importancia del sistema Kup de *R. tropici* para el crecimiento en medios de elevada osmolaridad y

su implicación en la fijación de N₂ en nódulos de *P. vulgaris* (Nogales et al. 2002). El empleo de resonancia magnética nuclear demostró, por otra parte, que la respuesta de *S. meliloti* al estrés hiperosmótico implica la síntesis y acumulación de N-acetilglutaminil-glutamina y de trehalosa cuando las células se someten a un estrés severo (Smith et al. 1989).

La trehalosa es un disacárido de glucosa no reductor ampliamente distribuido en la naturaleza que protege numerosas estructuras biológicas frente a estreses abióticos incluyendo la desecación, oxidación, calor, frío, deshidratación y condiciones hiperosmóticas (Welsh et al. 2000). También se ha establecido con claridad la importancia de la trehalosa en la osmotolerancia y nodulación de la alfalfa por *S. meliloti* (Dominguez-Ferreras et al. 2009b) y de soja por *B. japonicum* (Sugawara et al. 2010). Igualmente, se ha demostrado que la trehalosa juega un papel fundamental en la tolerancia a la desecación de *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (Macintire et al. 2007). También se ha demostrado que la sobreexpresión de la trehalosa 6-fosfato sintasa en *R. etli* incrementa la tolerancia a la sequía y el rendimiento de la cosecha de plantas de judía (Suárez et al. 2008).

Recientemente, Fernández-Aunión et al. (2010) han llevado a cabo un estudio sobre la síntesis y acumulación de solutos compatibles en 4 cepas de *Rhizobium* aisladas de nódulos de *P. vulgaris* y de la cepa tipo *R. tropici* CIAT 899^T. La cepa más tolerante al NaCl fue *A. tumefaciens* 10c2, seguida de *R. tropici* CIAT 899^T, *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* 31c3, *R. etli* 12a3 y *R. gallicum* *bv. phaseoli* 8a3. Los análisis de resonancia magnética de ¹³C y de ¹H demostraron que todas las cepas de *Rhizobium* sintetizaban trehalosa, mientras que *A. tumefaciens* 10c2 sintetizó manosacarosa. También se observó la síntesis de glutamato en *R. tropici* CIAT 899^T, *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* 31c3 y *A. tumefaciens* 10c2. Cuando el manitol se adicionó como fuente de C se acumuló en todas las cepas. La acumulación de trehalosa en *R. tropici* CIAT 899^T y de manosacarosa en *A. tumefaciens* 10c2 fue osmoregulada, lo que sugiere su implicación en la osmotolerancia. Además de trehalosa y glutamato, *R. tropici* CIAT 899^T también produjo glucano cíclico β-1,2. Los resultados obtenidos no pudieron demostrar una relación directa entre el contenido en trehalosa y la osmotolerancia de las cepas estudiadas, lo que indica la existencia de mecanismos adicionales de osmoadaptación en las mismas (Fernández-Aunión et al. 2010).

2. OBJETIVOS

Oujda es la capital de la región oriental de Marruecos, zona que se caracteriza por su clima semiárido, suelos salinos de pH alcalino y escasa fertilidad. No obstante, se considera una de las principales áreas productora de leguminosas grano, en general, y de judía, *Phaseolus vulgaris*, en particular. Las leguminosas se utilizan en todo Marruecos para consumo humano y animal y, en ocasiones, constituyen la base, y única alternativa junto con la patata, para la alimentación humana en zonas deprimidas, de escasos recursos.

La producción de leguminosas grano en los campos de Oujda se lleva a cabo en pequeñas parcelas que los agricultores cultivan utilizando apenas agua y ningún fertilizante nitrogenado. Y aún así la producción permite el consumo personal y para la venta en los mercados diarios. Desde hace algunos años se han desarrollado medianas explotaciones que tratan de aprovechar los escasos recursos de la zona para optimizar la producción de judía. El empleo de agua salinizada de pozo para el riego de estas explotaciones agrícolas agrava la situación natural de elevada concentración de sales de los suelos cultivados.

En las circunstancias mencionadas, el aporte de C para la nutrición y desarrollo de la judía procede del material vegetal, tallos y raíces, de las plantas que se dejan en el campo después de la cosecha, a las deyecciones de los animales que se permiten pastar en los campos de cultivo, y a la adición de estiércol procedente de los corrales caseros. Por otra parte, el N para el crecimiento vegetal depende casi exclusivamente de la fijación biológica de N_2 que se lleva a cabo en los nódulos de las plantas de judía. De hecho, diversos trabajos han demostrado la presencia de nódulos en las raíces de *P. vulgaris* cultivadas en la región oriental de Marruecos (Hilali et al. 1989; Bouhmouch et al. 2001, 2005; Priefer et al. 2001; Talbi et al. 2010).

De los diversos factores ambientales que afectan la producción de judía, las temperaturas extremas, la salinidad y la sequía concurren en los campos de cultivo de Oujda. Aunque los agricultores utilizan diferentes tipos de semillas, las variedades Coco y Flamingo de *P. vulgaris* están adaptadas a tales condiciones ambientales, por lo que se utilizan frecuentemente para la siembra. Dada la adaptación de las plantas a los estreses abióticos mencionados, cualquier intento de incrementar la productividad de los cultivos de judía debe centrarse, fundamentalmente, en tratar de aumentar la capacidad del microsimbionte para reducir N_2 .

Clásicamente se ha considerado que la inoculación de una leguminosa con diversas cepas de su microsimbionte específico y el posterior análisis de los parámetros

fisiológicos de cosecha, peso seco, contenido en N, etc., representa el mecanismo adecuado para seleccionar cepas con mayor eficiencia simbiótica. Durante este trabajo, además de diversas cepas de *Rhizobium*, se observó que la Betaproteobacteria *Burkholderia phymatum* era capaz de formar nódulos efectivos en la variedad Flamingo de judía cultivada en suelos semiáridos provenientes de Oujda. De ahí que fuese necesario tanto su identificación como el estudio comparativo de sus propiedades simbióticas en condiciones de estrés osmótico con las de *R. tropici* CIAT899, uno de los microsimbiontes mejor estudiados de la judía, del que se había comprobado su tolerancia a la salinidad (Nogales et al. 2002; Fernández-Aunión et al. 2010).

Numerosas evidencias experimentales han demostrado que el principal factor que regula la fijación de nitrógeno en respuesta a estreses ambientales tales como la sequía es la difusión de oxígeno a los nódulos (Minchin, 1997; Minchin et al. 2008). En este sentido, se ha demostrado en alfalfa y garbanzo que la tolerancia de las plantas a la salinidad está asociada a una mayor capacidad de consumo de oxígeno por los nódulos (Aydi et al. 2004; L'taief et al. 2007). El ATP necesario para la actividad de la enzima nitrogenasa se obtiene durante el funcionamiento de la cadena respiratoria que utiliza la oxidasa terminal *cbb₃*. Granados-Baeza et al. (2007) demostraron que la inoculación de plantas de judía con la cepa CFNX713 de *R. etli* que sobreexpresa la oxidasa terminal *cbb₃*, incrementó la fijación de N₂, el peso seco y el contenido en N de las plantas. Considerando estos antecedentes, una posible estrategia a abordar para mejorar la tolerancia de la simbiosis rizobio-leguminosa a la sequía o salinidad consistiría en la inoculación de la leguminosa con cepas que posean una elevada capacidad respiratoria.

De acuerdo con lo expuesto, se han planteado los siguientes objetivos:

1. Aislamiento, caracterización e identificación de endosimbiontes de nódulos de plantas de judía cultivadas en suelos semiáridos de Marruecos.
2. Determinar la osmotolerancia en vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris* de los nuevos endosimbiontes identificados.
3. Determinar la implicación de la sobreexpresión de la oxidasa terminal *cbb₃* en la respuesta de la fijación de nitrógeno a sequía.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Las cepas de *Burkholderia*, *R. tropici* y *R. etli*, así como los plásmidos utilizados en este trabajo, junto con sus características más relevantes, se indican en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

Tabla 1. Cepas bacterianas

Cepa	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Burkholderia</i>		
<i>B. phymatum</i> GR01, GR03, GR05, GR06	Cepas aisladas de nódulos de <i>Phaseolus vulgaris</i>	Talbi et al. 2010
<i>B. phymatum</i> GR01N	<i>B. phymatum</i> GR01 NaI ⁵⁰	Este trabajo
<i>B. phymatum</i> STM815 ^T	Cepa tipo	Elliott et al. 2007
<i>B. tuberum</i> STM678 ^T	Cepa tipo	Vandamme et al. 2002
<i>B. mimosarum</i> PAS44 ^T	Cepa tipo	Chen et al. 2006
<i>B. nodosa</i> Br3437 ^T	Cepa tipo	Chen et al. 2006
<i>B. phymatum</i> GR60	<i>B. phymatum</i> GR01N::miniTn7(Gm) _{PrrmB1-gfp-a} insertado en el cromosoma, NaI ⁵⁰ , Gm ¹⁰	Este trabajo
<i>R. tropici</i>		
CIAT899R	Cepa parental; Rif ²⁰	Martínez-Romero et al. 1991
CIAT61	CIAT899R::miniTn7(Gm) _{PA1/04/03-dsred-a} insertado en el cromosoma, Rif ²⁰ , Gm ¹⁰	Este trabajo
<i>R. etli</i>		
CE3	CFN42 NaI ²⁰	Noel et al. 1984
CFNX713	<i>R. etli</i> CFN42::fixGd::uidA. Contiene el plásmido pMGB3. sobreexpresa la oxidasa terminal <i>cbb₃</i> . NaI ²⁰ , Spc ¹⁰⁰	Granados-Baeza et al. 2007

Tabla 2. Plásmidos

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
miniTn7(Gm) <i>P_{AI/04/03}-dsred-a</i>	Codifica la proteína roja fluorescente DsRed. Se mantiene en <i>E. coli</i> XL-1 Blue. Gm ¹⁰	Koch et al. 2001; Lambertsen et al. 2004.
miniTn7(Gm) <i>P_{rmB1}-gfp-a</i>	Codifica la proteína verde fluorescente GFP. Se mantiene en <i>E. coli</i> XL-1 Blue. Gm ¹⁰	Koch et al. 2001; Lambertsen et al. 2004.
pUX-BF13	Plásmido basado en el replicón R6K. Proporciona en <i>trans</i> la función de transposición de Tn7. Ap ²⁰⁰ , mob ⁺ . Se mantiene en <i>E. coli</i> SM10/ λ pir	Bao et al. 1991.
pRK600	Proporciona funciones de transferencia. ColE1, <i>oriV</i> , RP4 <i>tra</i> ⁺ , RP4 <i>oriT</i> . Cm ⁵⁰ . Se mantiene en <i>E. coli</i> HB101.	Kessler et al. 1992.

Abreviaturas de los antibióticos utilizados

Ácido nalidíxico: Nal; ampicilina: Ap; cloranfenicol: Cm; gentamicina: Gm; rifampicina: Rif y espectinomicina: Spc

3.2. MEDIOS DE CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE CEPAS

3.2.1. Medio de cultivo para *E. coli*

Para el cultivo rutinario de *E.coli* se utilizó el medio Luria Bertani (LB, Miller, 1972):

NaCl	5 g
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Agua (desionizada)	1 L
pH	7.0

Para preparar medio sólido, se adicionó agar bacteriológico (15 g/L). El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min

3.2.2. Medio de cultivo para *Rhizobium*

Las cepas de *Rhizobium* se cultivaron de manera rutinaria en medio TY (Tryptone-Yeast Extract, Beringer, 1974):

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,5 g
Agua destilada	1 L
pH	7.0

Para preparar medio sólido, se adicionó agar bacteriológico (15 g/L). El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min

3.2.3. Medios de cultivo para *Burkholderia*

3.2.3.1. Medio TY (Beringer, 1974). Se utilizó para el cultivo rutinario de *Burkholderia* (ver apartado 2.2.).

3.2.3.2. Medio *Burkholderia* Agar culture (BAc. Estrada de los Santos et al. 2001). Se empleó como medio selectivo para el cultivo de *Burkholderia*.

Ácido azelaico	2.0 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g
L-citrulina	0.2 g
Agua destilada	1 L
pH	7.0

Para preparar medio sólido, se adicionó agar bacteriológico (15 g/L). La L-citrulina se esterilizó por filtración antes de su adición al medio. El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min

3.2.3.3. Medio MJV (Reis et al. 2004). Medio definido para la determinación de actividad nitrogenasa de *Burkholderia* en vida libre

Manitol	1,0 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g
CaCl ₂	0,02 g
Na ₂ MoO ₄	0,002 g
FeCl ₃	0,01 g
Agua destilada	1 L
pH	7.0

Para preparar medio semisólido se adicionó agar bacteriológico (7,5 g/L). Para preparar medio sólido, se adicionó agar bacteriológico (15 g/L). El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min

3.2.3.4. Medio BSE (Estrada-de los Santos et al. 2001). Se utilizó para la determinación de proteínas totales de *Burkholderia*

Succinato	5,0 g
K ₂ HPO ₄	0,4 g
KH ₂ PO ₄	0,4 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,2 g
Extracto de levadura.	0,5 g
Agua destilada	1 L
pH	7.0

Para preparar medio sólido, se adicionó agar bacteriológico (15 g/L). El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min

3.2.4. Otros medios

3.2.4.1. Medio Yeast Extract-Manitol Agar (YEM, Vincent, 1970). Se ha utilizado para el aislamiento de bacterias endosimbióticas a partir de los nódulos de las raíces de las leguminosas utilizadas en este estudio

Manitol	10 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,2 g
NaCl	0,1 g
Extracto de levadura	0,5 g
Agua destilada	1 L
pH	7.0

Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico (15 g/L). El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

3.2.4.2. Medio Manitol-79 (M79, Vincent, 1970). Medio definido para el cultivo de *B. phymatum* y *R. tropici*

Manitol	3,65 g
KNO ₃	0,55 g
NaCl	0,05 g
K ₂ HP0 ₄ x 3H ₂ O	0,35 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
MgSO ₄	0,20 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,04 g
Agua destilada	1 L
pH	7.0

Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico (15 g/L). El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min

3.2.5. Conservación de cepas bacterianas

Para la conservación prolongada de las distintas cepas se han utilizado criotubos que contenían glicerol estéril (concentración final 20%) a los que se adicionaron alícuotas de los distintos cultivos bacterianos en fase logarítmica de crecimiento (aprox. 10⁸ células/ml). Los criotubos se almacenaron a -80 °C.

3.2.6. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua destilada y posterior esterilización a través de filtros Minisart[®] NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. En el caso de la tetraciclina, rifampicina y cloramfenicol no fue necesaria su esterilización ya que se empleó alcohol o una mezcla hidroalcohólica para disolverlos.

3.3. TOMA DE MUESTRAS Y CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL SUELO. EXPERIMENTOS DE PLANTA-TRAMPA Y AISLAMIENTO DE BACTERIAS ENDOSIMBIÓTICAS DE NÓDULOS DE *PHASEOLUS VULGARIS*

3.3.1. Toma de las muestras

Las muestras de suelo se tomaron al azar, de 0 a 20 cm de profundidad, en 5 localizaciones diferentes próximas a Oulade Mansour (34° 24' 0" N, 4° 43' 48" W), población de la provincia de Oujda (Marruecos) (Fig. 3.1). En esta zona el maíz y la judía (*P. vulgaris*) se cultivan de forma rotatoria, sin adición de fertilizantes nitrogenados, durante, al menos, los últimos 30 años.

3.3.2. Características físico-químicas del suelo

El análisis físico-químico del suelo se llevó a cabo en el Laboratorio Agroalimentario de Atarfe (Granada), que pertenece a la Dirección General de Industria y Calidad Agroalimentaria de la Junta de Andalucía. El suelo es de textura arcillo-arenosa (55,18% de arena, 17,17% de limo y 27,65% de arcilla) y contiene 6,1% de carbonatos, 7,69% de carbono orgánico, 0.069% de nitrógeno total, 285 ppm de potasio y 6 ppm de fósforo. El pH (en agua) es de 8,1 y la concentración de sal es de 5,03 g/L.

3.3.3. Experimentos de planta-trampa

Parte del suelo se mezcló con arena estéril (1:1 v/v), se utilizó para preparar macetas de 1 kg de capacidad en las que se sembraron (4 semillas/maceta, 2 macetas) las semillas de judía (*P. vulgaris*, cv. Flamingo) previamente esterilizadas en superficie mediante tratamiento con ethanol 96% durante 30 segundos, H₂O₂ 15% v/v durante 8 min y finalmente abundante lavado con agua destilada estéril. Las macetas se trasladaron a un invernadero provisto de luz artificial (proporcionada por lámparas Sylvania/Grolux), y funcionando en las siguientes condiciones: fotoperiodo de 16/8 h de luz/oscuridad, 25 °C/18 °C de temperatura día/noche, y una humedad relativa del 60-80%. Las plantas se regaron con agua estéril de acuerdo a las necesidades del cultivo y se cultivaron hasta el 10% de floración (aproximadamente 35 días).

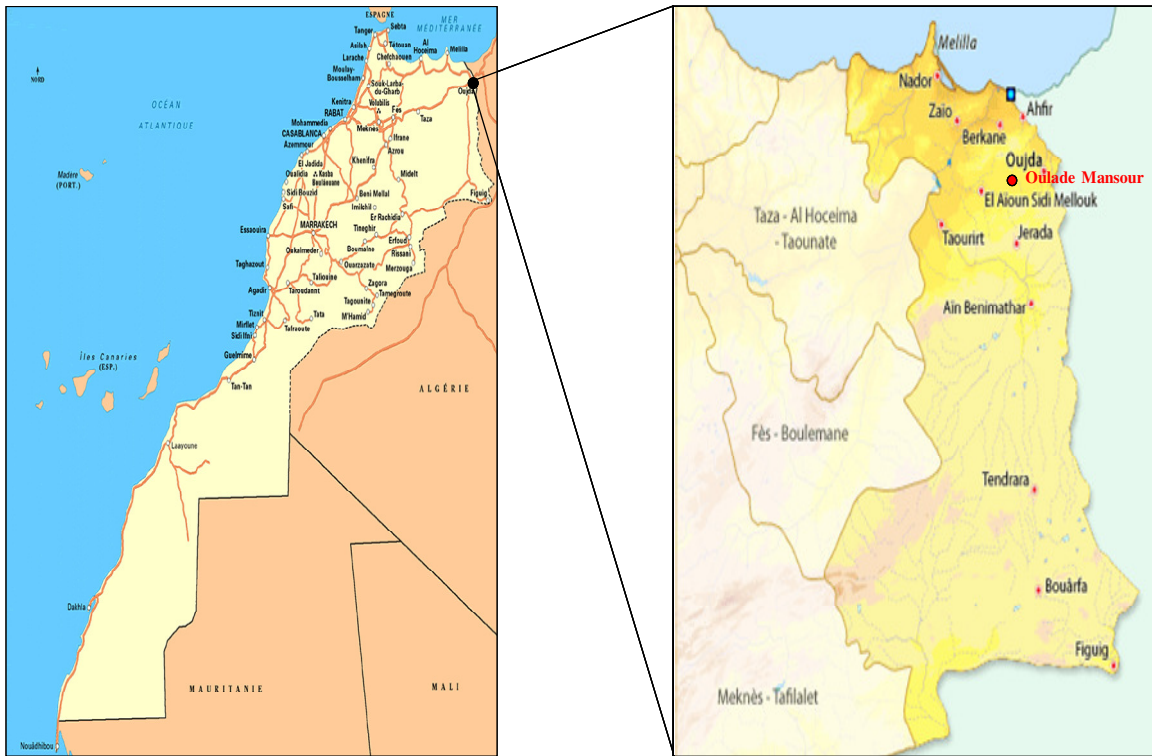


Figura 1. Mapa con la localización de Oulade Mansour (Oujda, Marruecos).

3.3.4. Esterilización de nódulos de judía y aislamiento de sus endosimbiontes

Después de su cultivo, las plantas se sacaron de las macetas y se lavaron las raíces con agua estéril. Los nódulos (10 nódulos/planta) se mezclaron, se esterilizaron con HgCl_2 al 0.25% durante 5 minutos y, finalmente, se lavaron abundantemente con agua destilada estéril. Se emplearon 50 nódulos, cada uno de los cuales se depositó en una placa Petri, se le adicionó 2 gotas de agua estéril y se machacó con una varilla de vidrio también estéril. El extracto resultante se utilizó para inocular placas Petri que contenían medio YEM. En ambos casos, el medio se suplementó con 200 $\mu\text{g/ml}$ de cicloheximida. Para comprobar la eficacia de la esterilización, 3 nódulos sin machacar se hicieron rodar sobre placas rellenas con el correspondiente medio. Todos los cultivos se incubaron a 30 °C durante 8 d. Las unidades formadoras de colonias (UFCs) con diferente morfología que aparecieron en las placas se seleccionaron mediante inspección ocular con una lupa de aumento 10X y cada una de ellas se resembró en placas Petri con medio YEM hasta la obtención de colonias morfológicamente uniformes.

3.4. IDENTIFICACIÓN GENOTÍPICA DE LAS CEPAS AISLADAS DE NÓDULOS DE JUDÍA

3.4.1. Extracción de ADN genómico

3.4.1.1. Método tradicional

Se ha utilizado la metodología descrita por Sambrook et al. (1989)

1. A partir de 3 ml de cultivo celular en medio TY se recogen las células mediante centrifugación en una microfuga a 12.000 rpm durante 3 minutos.
2. Lavar el precipitado con 250 μl de Sarcosyl 0,1% en TE. Centrifugar de nuevo para eliminar el detergente. Resuspender en 345 μl de TE.
3. Adicionar 5 μl de pronasa predigerida e incubar a 37 °C durante 2 h. La pronasa se prepara disolviendo 50 $\mu\text{g/ml}$ e incubando a 37 °C durante 2 h. Preparar alícuotas de 100 μl y congelar a -20 °C.
4. Adicionar 50 μl de sodio dodecil sulfato (SDS) 5% en Tris-EDTA [TE, 10 mM Tris y 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)]. Mezclar por inversión manual e incubar durante 1 hora a 37 °C.

5. Adicionar 120 µl de NaCl 5 M en TE. Mezclar de nuevo por inversión e incubar en hielo durante 1 h. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos. Pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
6. Adicionar al sobrenadante 1 volumen de fenol a pH 8 y mezclar manualmente. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo.
7. Adicionar al sobrenadante 75 µl de acetato sódico 3 M, pH 5,2.
8. Adicionar 1 volumen de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos y pasar el sobrenadante a un nuevo tubo. Repetir este paso dos veces más.
9. Adicionar 2 volúmenes de isopropanol. Dejar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Centrifugar a 12.000 rpm durante 10 minutos. Eliminar el sobrenadante y lavar con etanol al 70%. Secar las muestras al vacío.
10. Resuspender el ADN en 20 µl de TE o H₂O bidestilada y almacenar a -20 °C hasta su uso.

3.4.1.2. Método comercial

Se ha utilizado el método comercial denominado RealPure Genomic DNA Extraction, de Durviz, siguiendo las siguientes instrucciones del fabricante. En esencia:

1. Sedimentar las células (3 ml) por centrifugación a 12.000 rpm durante 2 minutos en tubos de microfuga (tubos eppendorf).
2. Tras eliminar el sobrenadante, pesar el sedimento (20-40 mg).
3. Resuspender el sedimento en 500 µl de tampón de extracción[®]. Adicionar 100 µl de solución de PVP[®] y agitar en vortex durante 20 segundos.
4. Adicionar 60 µl de solución de lisis y 3 µl de RNasa. Agitar la mezcla vigorosamente mediante vortex e incubar a 37 °C durante 30 minutos.
5. Enfriar las muestras a temperatura ambiente y adicionar 250 µl de tampón de precipitación de proteínas[®]. Agitar vigorosamente mediante vortex durante 20-30 segundos, e incubar a -20°C durante 10 minutos.
6. Centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos. Comprobar la aparición de precipitado proteico.
7. Recoger el sobrenadante, que contiene el ADN, en un tubo eppendorf con 600 µl de isopropanol enfriado previamente. Mezclar suavemente por inversión y centrifugar de nuevo a 14.000 rpm durante 3 minutos.

8. Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con 600 μ l de etanol al 70%. Mezclar de nuevo por inversión. Centrifugar de nuevo a 14.000 rpm durante 2 minutos.
9. Eliminar el etanol y secar al aire mediante inversión del tubo sobre papel absorbente durante 15 minutos.
10. Resuspender en 50 μ l de agua destilada estéril o tampón de hidratación[®]. Favorecer la resuspensión del ADN mediante inmersión del tubo en agua durante 30 minutos a 65 °C. Agitar manualmente de vez en cuando para asegurar la total resuspensión.
11. Almacenar a -20°C hasta su uso.

3.4.2. Cuantificación del ADN

Se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro NanoDrop, modelo ND1000 (Thermo Fisher Scientific, USA). La relación DO_{260}/DO_{280} se empleó para estimar la pureza de la preparación.

3.4.3. Identificación de *Burkholderia phymatum*

3.4.3.1. REP-PCR: Repetitive Extragenic Palindromic (REP)-Polymerase Chain Reaction (PCR)

Esta técnica utiliza los cebadores REPIR-I y REP2-I descritos por de Bruijn (1992):

Cebador	Secuencia
REP2-I	5'-ICG ICT CIG GCC TAC-3'
REPIR-I	5'-III ICG ICG ICA ICI GGC-3'

y la mezcla de reacción que se indica a continuación:

Productos y concentración inicial	Concentración final
Tampón de reacción 10X	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	0,2 mM
DMSO (99,5%)	
Cebadores (100 pmol de cada uno)	50 pmol
ADN polimerasa (Sigma)	2 U
ADN	20-50 ng
Agua mQ (Millipore)	
Volumen total	25 µl

Las siglas DMSO corresponden a dimetilsulfóxido y dNTPs a deoxirribonucleótidos trifosfato.

En el termociclador (Eppendorf MasterCycler) se utilizó el siguiente programa:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	
1 ciclo	95	6 min	Desnaturalización inicial
30 ciclos	94	1 min	Desnaturalización
	40	1 min	Hibridación de las cadenas de ADN y unión de los cebadores (“annealing”)
	65	8 min	Elongación
1	65	16 min	Elongación final

Los productos de PCR (10 µl) se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% preparado en solución tampón TBE (trizma base, 10 g/l; ácido bórico 5.5 g/l y EDTA, 0.90 g/l, pH 8.5) sometido a una corriente continua de 60 V. Antes de la carga, las alícuotas de ADN utilizadas se suplementaron (4:1 v/v) con solución de

carga (40% sacarosa y 0.25% azul de bromofenol). Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g/ml}$) y se fotografiaron bajo luz UV. Como marcador de peso molecular se utilizó Molecular Marker III (Roche). El análisis comparativo de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante REP-PCR se realizó con el paquete informático InfoQuest FP (versión 4.5) (Bio-Rad).

3.4.3.2. Amplificación del gen 16S rRNA

El gen *rrn16S* de *Burkholderia* se amplificó con los cebadores específicos Bphym-F y Bphym-R descritos por Wong-Villarreal et al. (2010):

Cebador	Secuencia
Bphym-F	5'-AAACTTCGCCGCCAATACCG-3'
Bphym-R	5'-GGCAAGGTTCCGTACATGTCA-3'

Y la mezcla de reacción que se indica a continuación:

Productos y concentración inicial	Concentración final
Tampón de reacción 10X	1X
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	200 μM
Cebadores(15 pmol/ μl)	0,6 picomol/ μl
ADN polimerasa (Sigma)	0,08 U
ADN	20-50 ng
Agua mQ	
Volumen total	25 μl

En el termociclador (Eppendorf MasterCycler) se utilizó el siguiente programa:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	
1	94	5 min	Desnaturalización inicial
30	94	1 min	Desnaturalización
	60	1 min	Hibridación de las cadenas de ADN y unión de los cebadores (“annealing”)
	72	5 min	Elongación
1	72	10 min	Elongación final

El producto de la amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% de la manera descrita en el apartado 4.3.1.

La amplificación del gen 16S rRNA de otras bacterias identificadas a lo largo de este estudio se llevó a cabo utilizando los cebadores fD1 y rD1 descritos por Weisburg et al. (1991).

Cebador	Secuencia
fD1	5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
rD1	5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Las concentraciones de cada uno de los productos necesarios para la mezcla de reacción, el programa del termociclador y la electroforesis de los productos de amplificación fueron idénticos a los indicados para la amplificación del gen 16S rRNA de *B. phymatum*.

3.4.3.3. Amplificación de los genes simbióticos *nifH* y *nodC*

Los genes *nodC* se amplificaron mediante el empleo de los cebadores FnodC y RnodC (Elliot et al. 2007). Para la amplificación de los genes *nifH* se utilizaron los oligonucleotidos IGK (Poly et al. 2001) y NDR-1 (Valdés et al. 2005) que se indican a continuación:

Cebador	Secuencias
FnodC	5'-GCGGAACTGATACTTAACGTCG-3'
RnodC	5'-CCACAGCTTGTCTGGTACAACGG-3'
IGK	5'-TACGGYAARGGBGGYATCGG-3'
NDR-1	5'-TTGGAGCCGGCRTANGCRCA-3'

Las mezclas de reacción para la amplificación contenían los siguientes productos:

Producto y concentración inicial	<i>NodC</i>	<i>nifH</i>
	Concentración final	Concentración final
Tampón de reacción 10X	1X	1X
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 mM	1,5 mM
dNTPs (10 mM)	200 µM	100 µM
Cebadores (4 µM de cada uno)	0,4-0,8 µM	0,005 µM
ADN polimerasa (Sigma)	0,04 U	1 U
ADN	20-50 ng	20-50 ng
Agua MQ	hasta 25 µl	hasta 25 µl
Volumen total	25 µl	25 µl

El programa de amplificación que se empleó en el termociclador (Eppendorf MasterCycler) fue el siguiente:

Ciclos	Temperatura	Tiempo	
1	94	3 min	Desnaturalización inicial
35	94	1 min	Desnaturalización
	55-57°	1 min	Hibridación de las cadenas de ADN y unión de los cebadores (“annealing”)
.	72°C	2 min	Elongación
1	72°C	3 min	Elongación final

El producto de la amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% en las condiciones descritas en el apartado apartado 4.3.1.

3.4.3.5. Purificación de los productos de amplificación

Después de su amplificación mediante PCR, previo a su secuenciación, el ADN se purificó utilizando el producto comercial QIAquick PCR Product Purification Kit (QIAGEN®), como se describe a continuación:

1. Adicionar 5 volúmenes de solución PB[®] al producto de PCR. Mezclar por inversión manual.
2. Pasar la mezcla a una columna de purificación[®], adaptarle el tubo receptor y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto.
3. Vaciar el líquido del fondo del tubo receptor.
4. Adicionar 570 µl de solución PE[®] previamente suplementada con 220 µl de etanol. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto.
5. Vaciar el líquido del fondo del tubo receptor. Centrifugar de nuevo a 13.000 rpm durante 1 minuto.
6. Colocar la columna sobre un nuevo tubo de microfuga, adicionar 20-50 µl de agua destilada estéril en el centro de la columna, esperar 1 minuto y, finalmente, centrifugar a 13.000 rpm durante 1 minuto.
7. Guardar a -20°C hasta su uso.

El ADN purificado se cuantificó de la forma descrita en el apartado 4.2.

3.4.4. Secuenciación de ADN y análisis informático de las secuencias

La mezcla de reacción para secuenciación de ADN se preparó en un tubo eppendorf de 0,5 ml que contenía ADN (0,4-1 µg), el cebador específico (6,4 picomoles) y agua bidestilada hasta un volumen final de 12 µl. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en un equipo Perkin Elmer, modelo ABI PRISM 3130xl, provisto de 16 capilares de 80 cm de longitud, utilizando el producto comercial Abi Prism (Perkin-Elmer) y la ADN polimerasa Amplitaq FS. La determinación de la secuencia se realizó mediante el sistema de terminadores marcados con fluorocromos.

Las secuencias obtenidas se visualizaron y limpiaron mediante el programa CHROMAS (disponible gratis en Internet, <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>) y se compararon con las depositadas en GenBank mediante el programa BLASTN disponible tanto en el European

Bioinformática Institute (EBI, <http://www.ebi.ac.uk>) como en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/).

Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el programa clustalW (Thompson et al. 1994). Para la elaboración del árbol filogenético se empleó el algoritmo neighbor-joining de Saitou y Nei (1987). Las distancias se calcularon utilizando el método de Jukes y Cantor (1969) con el programa MEGA versión 2.1 (Kumar et al. 2001).

3.5. IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA DE *B. phymatum* GR01

3.5.1. Perfil de proteínas totales

Se realizó utilizando la metodología propuesta por Estrada-de los Santos et al. (2001). Para ello:

1. A partir de 1 ml de cultivo celular en medio BSE se recogen las células mediante centrifugación en una microfuga a 12.000 rpm durante 10 minutos.
2. Resuspender en 70 μ l de tampón de extracción (Tris-HCl 0.125 M, SDS al 4 %, glicerol al 20 %, y mercaptoetanol al 10 %, pH = 6.8).

Para la electroforesis de los productos obtenidos se ha utilizado el método descrito por Laemmli (1970). Los geles de separación y de empaquetado se prepararon a una concentración final del 4% y 14% de acrilamida:bisacrilamida, respectivamente, como se indica a continuación:

Gel de separación (4%)		Gel de empaquetado (14%)	
Agua destilada	2,1 ml	Agua destilada	1,82 ml
Tris 1,5 M pH 8,8	2 ml	Tris 0.25 M, pH 6,8	0,75 ml
SDS 10%	80 μ l	SDS 10%	30 μ l
Acrilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	3,75 ml	Acrilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	0,4 ml
Persulfato amónico al 10%	50 μ l	Persulfato amónico al 10%	60 μ l
TEMED	4 μ l	TEMED	2,5 μ l

Como molde se emplearon placas de vidrio de 7 x 10 cm y espaciadores de 0,75 mm. La electroforesis se llevó en una cubeta Miniprotean II (Biorad) rellena de tampón de

electroforesis (Tris/Glicina pH 8,3 (X1): Glicina 14,41 g; Tris-Base 3,03 g; SDS 1 g) a un voltaje constante de 180 V, a temperatura ambiente. En cada carril se cargó 10 µl de cada muestra diluída (1/5 v/v) en tampón de carga (sodio dodecil sulfato (SDS) al 4%, ditioneitol (DTT) 0.1 M; glicerina 20%; Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, y azul de bromofenol 0,02%). Se utilizó el sistema comercial LMW-SDS Marker Kit® (Amersham) como marcador de tamaño molecular, cargando 5 µl por pocillo. Finalmente, después de la electroforesis (aproximadamente 45 minutos en las condiciones descritas), las proteínas se detectaron mediante tinción con Azul Coomassie (Coomassie Brilliant Blue R250, 1 g; metanol, 400 ml; ácido acético, 100 ml; agua destilada, hasta 500 ml) durante 15 minutos y posterior lavado con solución de desteñido (metanol, 250 ml; ácido acético, 100 ml; agua destilada, hasta 650 ml) durante 2 h. Finalmente, el gel se secó entre papel de celofán al aire libre.

Los perfiles de proteína de *B. phymatum* GR01 se compararon con los de las cepas tipo *B. phymatum* STM815^T, *B. tuberum* STM678^T, *B. mimosarum* PAS44^T y *B. nodosa* Br3437^T, todas ellas especies que nodulan leguminosas.

3.5.2. Resistencia natural a antibióticos

La resistencia natural de *B. phymatum* GR01 a diversos antibióticos se evaluó utilizando placas Petri que contenían medio TY estéril suplementado con concentraciones crecientes de los mismos. Los antibióticos utilizados fueron gentamicina (Gm), ampicilina (Ap), rifampicina (Rif), cloranfenicol (Cm), y ácido nalidíxico (Nal).

3.5.3. Utilización de fuentes de nitrógeno y de carbono y actividades enzimáticas

La utilización de diversas fuentes de carbono y nitrógeno se llevó a cabo utilizando los sistemas comerciales API 20NE, API 50CH y BIOLOG GN2 (este último se empleó por el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Germany). La inoculación se llevó a cabo de la manera recomendada por el fabricante.

3.5.4. Dendrograma basado en las características fenotípicas

El agrupamiento de las cepas por sus características fenotípicas se llevó a cabo mediante el programa informático MVSP (Multi-Variate Statistical Package), que

utiliza el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic means) para establecer el dendrograma correspondiente al árbol filogenético.

3.5.5. Actividad nitrogenasa en vida libre

La actividad nitrogenasa de *B. phymatum* GR01 se determinó mediante la reducción de acetileno a etileno en medio semisólido JMV (Reis et al. 2004). Para ello:

1. Cultivar *Burkholderia* en medio semisólido JMV suplementado con 20 mg/L de extracto de levadura hasta que se alcance una densidad óptica a 600 nm de aproximadamente 0,5. El medio debe ocupar aproximadamente los 2/3 del volumen total del tubo que se utilice. Los tubos tienen que ser capaces de cerrarse de forma hermética mediante tapones perforables. Incubar en condiciones aeróbicas rutinarias.
2. Tapar los tubos de forma hermética. Mediante una jeringa estéril sustituir el 10% del volumen gaseoso de cada tubo por acetileno. El acetileno se obtuvo mezclando agua y carburo cálcico.
3. Incubar a 30 °C. Detectar la formación de etileno inyectando alícuotas de la atmósfera interior de cada tubo en un cromatógrafo de gases. Se utilizó un cromatógrafo Hewlett-Packard, modelo 5890, equipado con un detector de ionización de llama y una columna metálica (180 x 3,2 mm) empaquetada con Porapak Q (80-100 mesh). Las temperaturas del horno, inyector y detector fueron 60 °C, 120 °C y 105 °C, respectivamente. Como gas portador se empleó nitrógeno a una presión de 2 bares. La aparición de los picos correspondientes a los diversos gases se recogió en un integrador Hewlett Packard modelo 3396. La incubación de las muestras se prolongó durante 1 semana.
4. La identificación del tiempo de retención del etileno se obtuvo utilizando diluciones de etileno puro (Air liquide). La concentración de etileno en las muestras se calculó por interpolación respecto a una curva patrón preparada utilizando etileno puro.

Durante estos experimentos se empleó la cepa STM815^T de *B. phymatum* como control, ya que se ha descrito su capacidad para reducir N₂ en vida libre (Elliott et al. 2007). También se comprobó la capacidad de las cepas para fijar N₂ suplementando el medio semisólido JMV con sulfato de amonio al 1%. La pureza de los cultivos al final de la incubación se comprobó de forma rutinaria inoculando placas Petri que contenían medio TY.

3.6. EFECTO DE ESTRESSES ABIÓTICOS SOBRE EL CRECIMIENTO DE *B. phymatum* GR01N.

3.6.1. Efecto de la salinidad

El efecto de la sal sobre el crecimiento de *B. phymatum* GR01N se realizó cultivando la bacteria en medio líquido M79 suplementado con 150, 300, 400, 500 y 600 mM de NaCl. El crecimiento se estimó como incremento de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Las determinaciones se efectuaron cada 12 horas desde el inicio del cultivo, durante 96 horas.

La capacidad de osmoadaptación se determinó también en placas Petri con medio M79 suplementado con las concentraciones de NaCl mencionadas anteriormente. Las placas se inocularon con 10 μ l de diluciones seriadas al décimo a partir de un cultivo de DO_{600} de 0,8. Se utilizaron las diluciones 10^{-3} hasta 10^{-6} UFCs. La cepa CIAT899R de *R. tropici* se utilizó como cepa de referencia.

3.6.2. Efecto de la sacarosa

Se estudió determinando el crecimiento de *B. phymatum* en medio líquido M79 suplementado con 150, 300, 400, 500 y 600 mM de sacarosa. La cepa CIAT899R de *R. tropici* se utilizó como cepa de referencia.

3.6.3. Efecto del pH

El efecto del pH sobre el crecimiento de *B. phymatum* GR01N se llevó a cabo de la manera descrita por Morón et al. (2005). En esencia, las células, a una DO_{600} inicial de aproximadamente 0,2, se cultivaron en medio TY suplementado en unos casos con 40 mM de ácido 2-(N-morfolino)etano sulfónico (MES, pH 5,5- 6,7) y, en otros, con 30 mM de ácido 4-(2-hidroxiethyl) piperazin-1-etanosulfónico (HEPES, pH 6,8- 8,2) y, en otros con 30 mM de 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD, pH 7.8-9.7). El valor de pH se comprobó después de autoclavar las soluciones correspondientes.

Las determinaciones se efectuaron cada 12 horas desde el inicio de cultivo durante 96 horas. La cepa CIAT899R de *R. tropici* se utilizó como cepa de referencia.

3.7. OBTENCIÓN DE CEPAS DE *RHIZOBIUM* Y *BURKHOLDERIA* QUE EXPRESAN PROTEÍNAS FLUORESCENTES

3.7.1. Transformación de *B. phymatum* GR01N y *R. tropici* CIAT899R

La transferencia se realizó mediante conjugación tetraparental utilizando *B. phymatum* GR01N y *R. tropici* CIAT899R como cepas receptoras, la cepa *E. coli* SM10/ λ pir que proporciona la función de transposición del transposón Tn7 en el plásmido pUX-BF13, la cepa HB101 de *E. coli*, que contiene el plásmido pRK600 y aporta la función de transferencia, y cada una de las cepas de *E. coli* XL-1 Blue con cada uno de los plásmidos miniTn7(Gm) $P_{A1/04/03}$ -*dsred-a* y miniTn7(Gm) P_{rrmB1} -*gfp-a*, que codifican la proteína roja fluorescente DsRed y la proteína verde fluorescentes GFP, respectivamente.

La conjugación se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Preparar cultivos de las cepas donadoras en fase logarítmica de crecimiento y de las cepas receptoras en fase exponencial tardía.
2. Centrifugar 5 ml de la cepa receptora (microfuga Eppendorf 4515D, 12.000 rpm., 3 minutos).
3. Sobre el sedimento de la cepa receptora, centrifugar 1 ml de cultivo de cada una de las cepas donadoras. Eliminar el sobrenadante. Lavar 2-3 veces con 1 ml de medio TY.
4. Resuspender el sedimento en 100 μ l de medio TY y adicionarlo, en forma de gota, sobre una placa Petri con medio TY sin antibióticos. Dejar secar e incubar a 30 °C durante 48 h.
5. Recoger la mezcla de conjugación con 1 ml del medio adecuado, BAc para *B. phymatum* GR01N y M79 para *R. tropici* CIAT899R.
6. Sembrar 100 μ l en placas Petri que contengan cada uno de los medios adecuados, suplementados con los antibióticos adecuados para la selección de los transconjugantes. Incubar a 30 °C hasta la aparición de colonias.
7. Repicar las colonias en medio BAc/M79, para *B. phymatum* GR01N/*R. tropici* CIAT899R, respectivamente, hasta asegurarse de la pureza de los transconjugantes.

3.7.2. Comprobación de la inserción en el cromosoma

La inserción en el cromosoma de los genes *dsred-a* y *gfp-a* se comprobó a partir de las colonias aparecidas en los medios selectivos mediante PCR en colonia. Para ello:

1. Picar cada una de las colonias seleccionadas con un palillo de dientes, resuspenderla en un tubo eppendorf con 50 μ l de agua bidestilada y calentar a 100 °C durante 5 minutos.
2. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos.
3. Recoger el sobrenadante en un tubo nuevo. Utilizar 5-10 μ l del mismo como fuente de ADN molde en la reacción de amplificación.

En caso necesario, cuando no se obtuvieron resultados mediante PCR en colonia, se llevó a cabo el aislamiento de ADN genómico tanto de *R. tropici* CIAT899R como de *B. phymatum* GR01N de la manera descrita en el apartado 4.1.2.

3.7.3. Amplificación y secuenciación de los genes *dsred-a* y *gfp-a*

La amplificación de los genes *dsred-a* y *gfp-a* se llevó a cabo mediante PCR utilizando los cebadores Tn7-Glms y Tn7-RR109 (Koch 2001), y

Cebadores	Secuencias
Tn7-Glms	5- AATCTGGCCAAGTCGGTGAC -3'
Tn7-RR109	5'- CAGCATAACTGGACTGATTCAG -3'

la siguiente mezcla de reacción:

Producto y concentración inicial	Concentración final
Tampón 10X	1X
MgCl ₂ (25 mM)	10 mM
dNTPs (10 mM)	200 μ M
Cebadores (10 pmol/ μ l)	0,4 pmol/ μ l
ADN polimerasa (Sigma, 5U/ μ l)	0,04 U
ADN	20-50 ng
Agua MQ	hasta 25 μ l
Volumen total	25 μ l

El programa del termociclador para la reacción de PCR se indica a continuación:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	
1	96	30s	Desnaturalización inicial
25	96	30s	Desnaturalización
	53	30s	Hibridación de las cadenas de ADN y unión de los cebadores (“annealing”)
	72	30s	Elongación
1	72	5 min	Elongación final

El producto de la amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1,2 % en las condiciones descritas en el apartado 4.3.1. Como marcador de peso molecular se utilizó una escalera de 100-1000 pares de bases (Dominion MBL).

En las condiciones descritas, el tamaño del ADN amplificado es de, aproximadamente, 150 pb.

Los productos de amplificación se limpiaron como se indica en el apartado 4.3.4, se prepararon para secuenciar (apartado 4.4) y se enviaron al Servicio de Secuenciación de la EEZ-CSIC.

3.8. PRODUCCIÓN DE SOLUTOS INTRACELULARES POR *B. phymatum*

3.8.1. Cultivo bacteriano

Se utilizó el medio M79 suplementado o no con 200 mM de NaCl. Las células se cultivaron hasta el final de la fase exponencial tardía cuando la DO_{600} es, aproximadamente 1,2.

3.8.2. Extracción de solutos intracelulares

Se ha seguido la metodología descrita por García-Esteba et al. (2006). A partir de 200 ml de cultivo bacteriano,

1. Recoger las células mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C.
2. Lavar el sedimento con medio M79 desprovisto de fuente de C.
2. Resuspender el sedimento en 10 ml de una mezcla de extracción compuesta por metanol:cloroformo:agua (10:5:4).
3. Incubar a 37 °C durante 30 minutos en suave agitación.

4. Centrifugar de nuevo para eliminar los restos celulares. Pasar el sobrenadante a nuevos tubos.
5. Añadir un volumen de un mezcla cloroformo: agua (1:1)
6. Centrifugar durante 10 minutos a 13.000 rpm a 4 °C. Recoger la fase acuosa.
7. Liofilizar el extracto obtenido

3.8.3. Identificación de solutos intracelulares

Se ha llevado a cabo mediante resonancia magnética nuclear, de la manera descrita por Fernández-Aunión et al. (2010). Para ello,

1. Los extractos celulares liofilizados se disolvieron en 0,5 ml de agua deuterada (D₂O).
2. Los espectros de abundancia natural de ¹³C-RNM se realizaron a una temperatura de 25 °C en un espectrofotómetro Bruker AV500 a 125 MHz.

Los desplazamientos químicos de los compuestos identificados, referidos al tetrametilsilano se indican en ppm. Las señales correspondientes a la trehalosa, manitol, alanina se asignaron en comparación con los valores químicos publicados anteriormente (Smith et al. 1990) y/o por comparación con ¹³C-RMN de los compuestos puros.

3.9. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS, GERMINACIÓN E INOCULACIÓN DE LAS PLÁNTULAS. CULTIVO DE PLANTAS

3.9.1. Esterilización de semillas y germinación

Las semillas de *P. vulgaris*, haba (*Vicia faba*) y guisante (*Pisum sativum*) se esterilizaron de la siguiente manera:

1. Sumergir las semillas en solución de etanol al 96% (v/v) durante 30 s.
2. Eliminar el etanol y adicionar una solución de lejía comercial diluída en agua (3:1 v/v) durante 5 minutos. Eliminar la lejía.
2. Lavar abundantemente con agua destilada estéril.
3. Imbibir las semillas durante 2 h en oscuridad a temperatura ambiente (8-10 h para *V. faba*).
4. Colocar las semillas en placas Petri conteniendo agar al 1%.
5. Germinar en oscuridad a 30 °C hasta que las radículas alcancen 1-2 cm de longitud.

En el caso de las semillas de *P. sativum*, después del primer lavado tras el tratamiento con lejía, se sumergieron en H₂O₂ durante 15 minutos y se lavaron de nuevo con abundante agua estéril antes de colocarlas en placas Petri para su germinación.

Las semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*) se esterilizaron de la siguiente manera:

1. Sumergir las semillas en una solución de HgCl₂ al 0,25% (p/v) en agua destilada durante 3 minutos.
2. Lavar abundantemente con agua destilada estéril.
3. Sumergir en una solución de H₂O₂ al 30% durante 15 minutos y lavar repetidamente con abundante agua destilada.
4. Colocar sobre placas Petri con agar al 1%.
5. Germinar en oscuridad a 30°C hasta que las radículas alcancen 1-2 cm de longitud.

Las semillas de soja (*Glycine max*) se esterilizaron de la siguiente manera:

1. Sumergir las semillas en solución de alcohol al 96% (v/v) durante 30 s.
2. Eliminar el etano y adicionar una solución de peróxido de hidrógeno (30%, v/v) durante 8 minutos.
3. Lavar con abundante agua destilada estéril.
4. Colocar en placas Petri con agar al 1%.
5. Germinar en oscuridad a 30 °C hasta que las radículas alcancen 1-2 cm de longitud.

Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol (*Trifolium repens*) se esterilizaron de la siguiente manera:

1. Sumergir las semillas en una solución de HgCl₂ al 2,5% durante 10 minutos en agitación.
2. Lavar con abundante agua destilada estéril.
3. Imbibir en agua destilada estéril durante 1-2 horas a temperatura ambiente, en agitación.
4. Lavar abundantemente con agua estéril y colocar sobre placas Petri con agar al 1%.
5. Germinar en oscuridad a 30 °C hasta que las radículas alcancen 1-2 cm de longitud

Las semillas de *Mimosa pigra*, *Prosopis laevigata*, *Acacia cochliacantha*, *A. bilimeki*, *Leucaena glauca*, *L. culinaris* y *L. corniculatus* se esterilizaron de la siguiente manera:

1. Escarificar las semillas mediante inmersión en ácido sulfúrico concentrado durante 10 minuto
2. Lavar abundantemente con agua destilada estéril.
3. Sumergir en lejía al 3% durante 10 minutos.
4. Lavar abundantemente con agua estéril.
5. Colocar las semillas en placas Petri con agar al 1%.
6. Germinar en oscuridad a 30 °C hasta que las radículas alcancen 1-2 cm de longitud.

3.9.2. Solución nutritiva para el cultivo de plantas

Se ha empleado la solución mineral descrita por Rigaud y Puppo (1975), cuya composición se describe a continuación:

Macroelementos (por litro de agua)

KH_2PO_4	68 mg
K_2HPO_4	44 mg
$\text{SO}_4\text{Mg} \times 7\text{H}_2\text{O}$	123 mg
K_2SO_4	174 mg
SO_4Ca	173 mg
EDTA férrico (forma comercial Secuestrene)	25 mg

Microelementos (por litro de agua):

$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,11 mg
BO_3H_3	2,85 mg
$\text{SO}_4\text{Mn} \times 4\text{H}_2\text{O}$	3,07 mg
$\text{SO}_4\text{Zn} \times 7\text{H}_2\text{O}$	0,55 mg
$\text{SO}_4\text{Cu} \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,20 mg

La solución se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

3.9.3. Preparación de inóculos bacterianos

Todos los inóculos bacterianos se obtuvieron a partir de cultivos frescos en los correspondientes medios sólidos, hasta obtener una suspensión bacteriana de, aproximadamente, 10^8 células viables por ml. La cantidad de células viables se estimó

calculando el número de UFCs. Cada semilla se inoculó con 1 ml de la correspondiente suspensión bacteriana.

3.9.4. Cultivo de plantas

3.9.4.1. Cultivo en jarra Leonard

El cultivo se llevo a cabo utilizando jarras Leonard (Leonard, 1943). Este sistema consta de dos recipientes independientes, de manera que el superior se rellena con vermiculita y el inferior con solución nutritiva de Rigaud y Puppo (1975). El conjunto se esteriliza mediante autoclave a 120 °C durante 20 minutos. En cada jarra se siembran las semillas pregerminadas y se inoculan con 1 ml de la suspensión bacteriana en estudio. La capa superficial de vermiculita se cubre con una capa de perlita estéril, que evita la posible contaminación ambiental y refleja la luz por lo que previene el calentamiento excesivo de las semillas. Cada jarra se envuelve en papel opaco a la luz para evitar que ésta alcance las raíces.

Las jarras se trasladaron a un invernadero funcionando en condiciones controladas (500 $\mu\text{m} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ de longitud de onda de onda, 400-700 nm de intensidad luminosa, fotoperíodo de 16/8 horas luz/oscuridad, 23/17 °C de temperatura día/noche y 50% de humedad relativa).

3.9.4.2. Cultivo en maceta

Para algunos experimentos se emplearon macetas, de distinta capacidad, que se rellenaron con el sustrato adecuado, normalmente una mezcla de arena y vermiculita (1/1 v/v). Las macetas se esterilizaron en autoclave a 120 °C durante 20 minutos. Las semillas esterilizadas y germinadas se siembran en las macetas en condiciones de esterilidad y se inoculan con 1 ml (aproximadamente 10^8 células viables/ml) de la suspensión bacteriana correspondiente. Finalmente, las macetas se trasladan al invernadero (ver apartado 3.3) para el cultivo de las plantas.

3.9.4.3. Cultivo en tubos de vidrio

Una vez germinadas, las semillas con un grado de desarrollo uniforme, se colocaron sobre un papel de filtro colocado en el interior de tubos de cristal de 20 x 200 mm que contenían la solución mineral de Rigaud y Puppo (1975). En cada tubo se colocó una plántula que se inoculó, de forma independiente, con 1 ml de una suspensión de *B. phymatum* GR60 o de *R. tropici* CIAT 899R61 (10^8 células/ml). En los experimentos de

coinoculación, las suspensiones celulares se mezclaron de manera que el número de UFCs fuera el mismo. Posteriormente, los tubos se cubrieron con papel de aluminio y se trasladaron a una cámara de crecimiento de plantas funcionando en las siguientes condiciones: fotoperíodo de 16/8 h luz/oscuridad, 25 °C/17 °C temperatura día/noche, y una humedad relativa del 70-75% (Delgado et al. 1998).

3.10. EFECTO DE LA SAL EN LA SIMBIOSIS *P. vulgaris*-*B. phymatum* y *P. vulgaris*-*R. tropici*

3.10.1. Inoculación y cultivo de plantas. Peso seco y contenido en N de las plantas. Contenido en leghemoglobina de los nódulos

Para estos estudios, las plantas se cultivaron en jarras Leonard y se inocularon, de forma independiente, con *B. phymatum* GR01N y *R. tropici* CIAT899R. La solución mineral se suplementó con 25, 35 y 50 mM de NaCl. Las plantas se cultivaron durante 35 días, tiempo necesario para alcanzar, aproximadamente, el 10% de floración.

El peso seco de las plantas se determinó después de su secado en horno a 60 °C durante 2 días. El contenido en nitrógeno se determinó mediante digestión Kjeldahl siguiendo la metodología de Brouat y Crouzet (1965).

El contenido en leghemoglobina de los nódulos se determinó mediante fluorimetría de la manera descrita por Sánchez et al. (2010), según el protocolo original de LaRue y Child (1979), como se indica a continuación:

1. Homogeneizar 0,250 g de nódulos en 5 ml de solución de extracción [50 Mm $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ PH 7,4, 0,02% de ferricianida potásica ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) y 0,1% de carbonato sódico (NaH_2CO_3)], suplementado con 0,1% de polivinilpolipirrolidona (PVPP).
2. Centrifugar el homogeneizado a 14.000 rpm durante 20 minutos.
- 3 Tomar alícuotas de 50 μl del sobrenadante y adicionar 3,15 ml de ácido oxálico al 16,6%.
4. Incubar las muestras a 120 °C durante 30 minutos en un autoclave. Como blanco, en todos los casos, se incluyó una alícuota de extracto sin incubar.
- 5) Medir la emisión de la fluorescencia de las soluciones una vez enfriadas.

La emisión de fluorescencia se cuantificó en un espectrofluorímetro (Shimadzu RS-540) equipado con una lámpara de mercurio-xenon y un fotomultiplicador RF-549 sensible al rojo a una longitud de onda de excitación de 405 nm y de emisión de 650

nm. La diferencia en la emisión de fluorescencia entre las muestras incubadas y su correspondiente blanco fué proporcional a la concentración de leghemoglobina de las mismas.

3.10.2. Ocupación de los nódulos de judía basada en el empleo de antibióticos

Para los estudios de competitividad, las plantas se cultivaron en jarras Leonard y se inocularon con una mezcla de *B. phymatum* GR01N y *R. tropici* CIAT899R de manera que el número de UFCs correspondiente a cada cepa fuera el mismo. La solución mineral se suplementó o no con 25, 35 y 50 mM de NaCl. Las plantas se cultivaron durante 30-35 días, tiempo necesario para alcanzar, aproximadamente, el 10% de floración.

Se han utilizado 200 nódulos por tratamiento, que se esterilizaron superficialmente y se machacaron con una varilla de virio estéril. La suspensión resultante se utilizó para inocular placas Petri que contenían medio TY suplementado, en unos casos, con ácido nalidíxico (sólo permite el crecimiento de *B. phymatum* GR01N) y, en otros, con rifampicina (sólo permite el crecimiento de *R. tropici* CIAT899R). Como control se utilizó medio TY sin antibióticos.

3.10.3. Emisión de fluorescencia por células en vida libre

La emisión de fluorescencia por las proteínas GFP y DsRed en células en vida libre de *B. phymatum* GR60 y *R. tropici* CIAT61 se comprobó utilizando cultivos bacterianos en medio TY. Unas pocas gotas de la suspensión celular se colocaron sobre un portaobjetos y se examinaron con un microscopio de barrido laser confocal disponible en el Servicio de Microscopía de la Estación Experimental del Zaidín CSIC, Granada. Se trata de un microscopio invertido Nikon Eclipse TE2000-U equipado con un objetivo CFI PL APO 60x AN 1,4 WD 0,21 mm, que utiliza aceite de inmersión. Es un equipo modular provisto de un módulo confocal, no espectral, con detección simultánea de cuatro canales (tres láseres mas 1 canal diascópico de transmisión DIC) y un “pinhole” variable motorizado (tres tamaños + abierto). La resolución de escaneo alcanza hasta 2048 x 2048 píxeles (12 bits). Dispone de un motor piezoeléctrico para el eje z. Los láseres disponibles son de Ar (488 nm, 40mW), He-Ne (543 nm, 2mW) y He-Ne (633 nm, 1 mW).

3.10.4. Ocupación de los nódulos de judía basada en la emisión de fluorescencia

Para estos estudios las plantas se cultivaron en jarras Leonard y se inocularon con una mezcla de *B. phymatum* GR60 y *R. tropici* CIAT61 de manera que el número de UFCs correspondiente a cada cepa fuera el mismo. La solución mineral se suplementó o no con 35 mM de NaCl. Las plantas se cultivaron durante 30-35 días, tiempo necesario para alcanzar, aproximadamente, el 10% de floración.

Se utilizaron 20 nódulos que se esterilizaron superficialmente (ver apartado 3.4), se cortaron en dos mitades, se colocaron sobre un portaobjetos y se cubrieron con unas gotas de agua. La observación microscópica se llevó a cabo de la manera descrita en el apartado 10.3.

3.10.5. Infección de *P. vulgaris* por *B. phymatum*

El cultivo de las plantas en tubos de cristal se aprovechó para tratar de analizar la vía de infección de la judía por *B. phymatum*, utilizando la cepa GR60 para inocular las plantas. En este caso, la solución nutritiva no se suplementó con NaCl. Se emplearon raíces de plantas cultivadas de 3 a 9 d. Para la observación microscópica se procedió de manera similar a la descrita en el apartado 10.3.

3.11. RESPUESTA A LA SEQUÍA DE PLANTAS DE *P. vulgaris* INOCULADAS CON *R. etli* CFNX713

3.11.1. Inoculación y cultivo de plantas

Para los experimentos de estrés hídrico se utilizaron macetas de 2 Kg de capacidad rellenas de una mezcla (1/1 v/v) de arena y vermiculita. Las macetas se sembraron con plántulas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa que se inocularon, de forma independiente, con 1 ml de una suspensión bacteriana (aproximadamente 10^8 células/ml) de *R. etli* CE3 y su mutante derivada *R. etli* CFNX713. Las plantas se cultivaron en invernadero (ver apartado 3.3) durante 21 días. En ese momento, las macetas correspondientes a cada cepa se distribuyeron al azar en tres grupos, uno de los cuales se mantuvo como control, otro se dejó de regar durante 5-7 días y otro no se regó durante 10-12 días. El potencial hídrico foliar (Ψ_w) se determinó en hojas situadas en el tercio superior de la parte aérea con un Wescor's Microvoltímetro HR-33T.

El peso seco y el contenido en N de las plantas se determinó como se indica en el apartado 10.1. Los nódulos se separaron de las raíces, se sumergieron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su empleo.

3.11.2. Actividad nitrogenasa de los nódulos

La actividad nitrogenasa de los nódulos se determinó mediante la técnica de reducción de acetileno a etileno siguiendo la metodología descrita en el apartado 5.8. Se utilizaron 0,3 g de nódulos que se colocaron en tubos de 17 ml de capacidad provistos de tapón rosca. Los nódulos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h y se tomaron alícuotas de la atmósfera interior de los tubos a los 10 y 20 minutos.

3.11.3. Aislamiento de bacteroides

Los bacteroides se aislaron a partir de 1 g de peso fresco de nódulos de *P. vulgaris* de acuerdo a la metodología indicada previamente (Delgado et al. 1993). Para ello:

1. Macerar los nódulos en 5 ml de tampón de aislamiento (Tris HCl 50 mM, pH 7,5, suplementado con 200 mM de manitol).
2. Centrifugar a 1.500 rpm durante 5 minutos.
3. Pasar el sobrenadante a nuevos tubos y centrifugar a 9.000 rpm durante 10 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante y lavar dos veces el sedimento con tampón de lavado.
6. Resuspender el sedimento en 2,5 ml de tampón Tris HCl 50 mM pH 7,5.

Todas las manipulaciones deben realizarse en hielo o en cámara a 4 °C.

3.11.4. Detección de citocromos c en bacteroides

3.11.4.1. Preparación de membranas celulares

1. Después de su aislamiento de los nódulos, lavar los bacteroides con tampón de lavado (50 mM de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6,8; 1 mM MgCl_2 ; 0,1 mM CaCl_2 y 0,9% NaCl).
2. Resuspender el sedimento en 3 ml de tampón de fraccionamiento (tampón de lavado adicionado de 1 mM de fluoruro de ácido fenil sulfónico (PMSF), DNAsa (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y RNAsa (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$).
3. Romper las células en una célula de presión (SLM, Aminco) preenfriada en hielo mediante diferencias presión (120 MPa) utilizando una prensa de French (SLM, Aminco). Repetir el proceso 2-3 veces.
4. Centrifugar el extracto celular resultante (10.000 rpm., 10 minutos, 4 °C) para sedimentar las células que no se hayan roto. Recoger el sobrenadante y recentrifugar

(45.000 rpm., 1 h, 4 °C). Se utilizó una ultracentrífuga Beckman® provista de un rotor modelo 70Ti.

5. Recoger el sobrenadante

6. Resuspender el sedimento, que contiene las membranas celulares, en 100 µl de tampón de fraccionamiento, y distribuirlo en tubos de microfuga (20 µl/tubo). Conservar a -20 °C hasta su utilización.

3.11.4.2. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida [Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)-Polyacrilamide Gel Electroforesis (PAGE)] (SDS-PAGE)

Se ha empleado el método descrito por Laemmli (1970). Los geles de separación y de empaquetado se prepararon a una concentración final del 12% y del 15% de acrilamida:bisacrilamida, respectivamente, como se indica a continuación:

Gel de separación (12%)		Gel de empaquetado (15%)	
Agua destilada	4,6 ml	Agua destilada	3,1 ml
Tris 1,5 M pH 8,8 + SDS 0.4 %	5 ml	Tris 0.25 M pH 6,8 + SDS 0.4 %	5,0 ml
EDTA 0,1 M pH 7,5	0,4 ml	EDTA 0,1 M pH 7,5	0,2 ml
SDS 10%	0,2 ml	SDS 10%	0,1 ml
Acrilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	8 ml	Acrilamida:Bisacrilamida (29,2:0,8), 30%	1,7 ml
Persulfato amónico 10%	200 µl	Persulfato amónico 10%	150 µl
TEMED	10 µl	TEMED	10 µl

Como molde se emplearon placas de vidrio de 7 x 10 cm y espaciadores de 0,75 mm. La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta Miniprotean II (Biorad) rellena de tampón de electroforesis (A partir de una solución stock 5x (Tris 15 g, glicina 72 g, agua destilada hasta 1 litro), adicionar 10 ml de SDS al 10% a 200 ml del stock y completar con agua destilada hasta 1 l.). La intensidad de la corriente fue de 20 mA y la temperatura de 4 °C. En cada carril se cargó 25 µg de proteína diluída (1/5 v/v) en tampón de carga (Tris 30 mM pH 6.8, glicerol 10%, SDS 1 %, EDTA 1 mM, beta-mercaptoetanol 5%, azul-bromofenol 0.1%)

3.11.4.3. Transferencia a membranas de nitrocelulosa

Después de la electroforesis (aproximadamente 3 h en las condiciones descritas anteriormente), las proteínas se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) de la forma descrita por Bradley et al. (1988). Para ello:

1. Sumergir la membrana de Immobilon-P durante 15 s en metanol, 2 minutos en agua desionizada y, por lo menos, 5 minutos en tampón de transferencia (Tris 25 mM; glicina 192 mM; metanol 20% v/v; pH 8,3.).
2. Entre las dos esponjas de la cubeta de transferencia empapadas en tampón de transferencia se colocó, por este orden, una hoja de papel Whatman 3MM también empapado en tampón de transferencia, el gel de poliacrilamida, la membrana y, finalmente, otro papel Whatman 3MM. La unidad así preparada se colocó en la cubeta y la transferencia se llevó a cabo aplicando una intensidad de 10 mA durante 3 h.
3. Después de la transferencia, sumergir la membrana en tampón PBS ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 80 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 20 mM; NaCl 100 mM; pH 7,5).

3.11.4.4. Detección de citocromo *c* mediante quimioluminiscencia

La detección de proteínas que pudieran contener hemo *c* unido covalentemente se realizó mediante la técnica descrita por Delgado et al. (2003). Para ello:

1. Incubar la membrana con solución de quimioluminiscencia (Luminol (Roche®) 8,0 mg en 20 ml de solución Tris-HCl 50 mM pH 8,6 y NaCl 150 mM) a la que antes de su utilización se adicionan 200 μl de 4-iodofenol al 1% en dimetilsulfóxido y 3,2 μl de H_2O_2 30%). Incubar en oscuridad durante 3 minutos.
2. Colocar una película autorradiográfica (Hyperfilm β -max, Amersham) sobre la membrana, envolverlas en una bolsa de plástico transparente y esperar 10-30 minutos.
3. Revelar la película utilizando revelador y fijador TETENAL[®], a las diluciones y tiempos recomendados por el fabricante.
4. Secar la película.
5. Teñir la membranas con rojo Ponceau (Rojo Ponceau S 0,4% (p/v) en ácido tricloroacético 3% (v/v).) durante 5 minutos. Desteñir con agua desionizada.

3.11.4.5. Determinación de proteína

Se ha utilizado el sistema comercial que emplea el reactivo de Biorad. Este método se empleó para determinar la concentración de proteína en células enteras y en extractos

libres de células. En células enteras es necesario realizar el tratamiento previo de lisis que se describe a continuación:

1. Tomar alícuotas de la muestra y adicionar 1 volumen de NaOH 1 N. Agitar en vórtex y hervir durante 20 minutos. Centrifugar a 12.000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. Tomar alícuotas de 25-50 μ l de las muestras y completar con agua destilada hasta un volumen final de 500 μ l.

Una vez lisadas las células el protocolo es común para todo tipo de muestras:

2. Tomar alícuotas de las muestras convenientemente diluídas y completar con agua destilada hasta un volumen final de 800 μ l.
3. Adicionar 200 μ l de reactivo de Bradford (Biorad).
4. Agitar en vórtex e incubar entre 2 y 60 minutos. La concentración de proteína se calcula después de registrar los valores de absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 595 nm frente a un blanco que contiene 800 μ l de agua y 200 μ l del reactivo de Bradford.

La concentración de proteína se calculó mediante interpolación respecto a una curva patrón que se preparó con albúmina bovina (Sigma).

3.11.5. Actividad respiratoria de los bacteroides

La actividad respiratoria de los bacteroides se determinó mediante un electrodo de oxígeno (Hansatech) de la manera descrita por Bueno et al. (2009) basada en el protocolo original de Delgado et al. (1993).

3.11.5.1. Calibración del electrodo

1. El nivel máximo de oxígeno en la célula del electrodo (100%, aproximadamente 253 nmoles de O₂/ml) se registró adicionando a la célula 1 ml de agua destilada que se mantuvo en agitación constante.
2. El nivel mínimo de oxígeno (0% del registro) se obtuvo adicionando ditionito sódico para reducir el O₂.
3. Cerrar la célula enroscando el émbolo hasta enrasarlo con el líquido de su interior. Evitar la formación de burbuja. Mantener la agitación hasta que se registre el 0%.
3. Lavar la célula con abundante agua destilada antes de su uso y mantener húmeda la membrana.

3.11.5.2. Determinación de la actividad respiratoria

Para determinar el consumo de oxígeno se utilizó el siguiente protocolo:

Adicionar a la célula de oxígeno:

1. 800 µl de tampón fosfato 25 mM, pH 7,5.
2. 200 µl de suspensión bacteroidal (1-2 mg de proteína)
3. Cerrar la célula.
4. Registrar el consumo de oxígeno a lo largo del tiempo hasta su consumo, manteniendo la agitación continua.

Todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente.

El cálculo del oxígeno consumido se obtuvo de la ecuación:

$$253 \text{ (nmoles O}_2\text{/ml)} \times V/100$$

$$\text{Nmoles O}_2\text{/min/mg proteína} = \frac{\text{253 (nmoles O}_2\text{/ml)} \times V/100}{\text{mg proteína}}$$

donde V es la velocidad del consumo de oxígeno.

3.11.6. Extracción de proteínas solubles del nódulo

La extracción de proteínas se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Wright et al. (1998):

1. Triturar 200 mg de nódulos en un mortero con nitrógeno líquido.
2. Homogeneizar los nódulos triturados con 1 ml de tampón de extracción (50 mM Hepes-, pH 8, 5 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 1 mM MnCl₂, 1 mM CaCl₂, 1 mM benzamidina, 1 mM 1,4-DTT, 0,1 mM fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMAF)).
3. Transferir el extracto a un tubo de microfuga. Se puede lavar el mortero con tampón de extracción y adiconarlo al extracto.
4. Centrifugar a 13.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Transferir el sobrenadante, que contiene las proteínas solubles, a un tubo nuevo.

3.11.7. Determinación de ácidos orgánicos del nódulo

Los ácidos orgánicos malato, succinato, citrato y α-cetoglutarato se extrajeron a partir de extractos de 200 mg de nódulos con ácido tricloroacético al 5% (p/v) de acuerdo a la metodología publicada por Gálvez et al. (2005):

1. Centrifugar el extracto a 7.300 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Recuperar el sobrenadante.

2. Mezclar el sobrenadante con el mismo volumen de éter dietílico saturado en agua. Desechar el éter conservando la fase superior acuosa. Repetir 5 veces.
3. Burbujear la fase acuosa con N₂ durante 2 minutos y pasarla a través de un filtro de 0,45 µm. A continuación, congelar las muestras en nitrógeno líquido y guardar a -20°C hasta su utilización.
4. Finalmente, los ácidos orgánicos se cuantificaron mediante cromatografía iónica en un cromatógrafo DX-500 System (Dionex, Sunnyvale, EEUU) utilizando una columna IonPac AS11 (Dionex) y un gradiente (NaOH 2,5 mM/MeOH 18% a NaOH 45 mM/MeOH 18% en 13 minutos).

3.11.8. Determinación de adenilatos (carga energética)

A partir de los extractos obtenidos en el apartado 11.7, los niveles de AMP, ADP y ATP se determinaron mediante electroforesis capilar de alta resolución (HPCE, High Performance Capillary Electrophoresis) en un sistema de electroforesis PACE 5500 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, EE.UU). Los electrolitos empleados fueron Tris 20 mM y Na₂HPO₄ X 7H₂O 20 mM, pH 7, suplementado con bromuro de dodecil trimetil amonio (DTAB) 100 mM y EDTA 1 mM. Se utilizó un capilar de 50 µm de diámetro interno y 62/69 cm de longitud y un detector ultravioleta a 260 nm. El potencial aplicado fue de 30 KV.

La cuantificación se realizó por interpolación con rectas patrón de AMP, ADP y ATP calculadas para rangos de concentración de 0,005 a 0,1 mM.

La carga energética (ACE) se calculó mediante la fórmula:

$$ACE = [ATP + 0.5 ADP]/[ATP + ADP + AMP]$$

3.11.9. Contenido en azúcares

Para la extracción de los azúcares del nódulo se utilizó el protocolo de González et al (1995), que se indica a continuación:

1. Triturar 200 mg de nódulos con nitrógeno líquido
2. Adicionar 500 µl de TCA al 16% en dietil-éter por cada 100 mg de nódulos. Agitar la mezcla de forma vigorosa e incubar en hielo durante 30 minutos como mínimo.
3. Adicionar medio volumen de 5 Mm de ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), Mezclar e incubar en hielo durante la noche.

4. Centrifugar a 13.000 rpm durante 10 minutos. Se observa un precipitado que contiene el almidón presente en el tejido junto con restos celulares, una fase inferior acuosa donde se localizan los azúcares solubles y la fase orgánica superior.
5. Tomar la fase acuosa y pasarla a un nuevo tubo. Adicionar 1 volumen de éter saturado en agua, Repetir 3 veces.
6. Finalmente, eliminar el máximo éter posible mediante volatilización. Guardar a -20 °C hasta su empleo.

El contenido en sacarosa se determinó mediante el procedimiento de González et al (1995), que se indica a continuación, utilizando un lector de microplacas (Sunrise, TEKAN).

1. En cada pocillo de una microplaca adicionar 200 µl de una mezcla de reacción compuesta por 100 mM HEPES, pH 7,0, 3 mM MgCl₂, 0,75 mM NADP, 0,85 mM adenosina trifosfato (ATP), 0,1 unidad (U) de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y 5 µl de proteínas de nódulos de extracto.
2. Introducir la microplaca en el lector y esperar 5 minutos. Determinar la absorbancia a 340 nm.
3. Adicionar 2 µl de hexokinasa (0,6 U) a cada pocillo. Mantener la reacción 25 minutos, determinando la absorbancia a 340 nm durante ese tiempo.
4. Finalmente, adicionar 4 µl de invertasa de levadura (20 U) a cada pocillo. Mantener la reacción 30 minutos, determinando la absorbancia a 340 nm durante ese tiempo

3.11.10. Actividad sacarosa sintasa

La actividad sacarosa sintasa se calculó determinando la cantidad de NADPH producido como consecuencia de la hidrólisis de la sacarosa en presencia de UDP (Wright et al. 1998). Se empleó la siguiente metodología:

1. Preparar alícuotas de 100 µl de una mezcla de reacción que contiene 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 400 mM sacarosa, 5 mM uridina difosfato (UDP) y 20 µl de extracto de proteínas (ver apartado 11.6).
2. Incubar la mezcla a 37 °C durante 30 minutos. Detener la reacción calentando a 95 °C durante 4 minutos.
3. Adicionar 100 µl de 10 mM NAD, 5 µl de UDP-glucosa deshidrogenasa (0,01 U) y 795 µl de 200 mM de glicina-KOH, pH 8,9.
4. Determinar la absorbancia a 340 nm. Se empleó un espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

Como blanco, en todos los casos, se incluyó una alícuota de extracto inactivado mediante calentamiento a 95 °C durante 5 minutos.

Los moles de NADPH producidos se calcularon utilizando el coeficiente de extinción molar del NADH ($6,31 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

3.12. EXPRESIÓN DEL GEN *PvSSn* EN NÓDULOS DE JUDÍA

3.12.1. Aislamiento de ARN total

La obtención de ARN total a partir de nódulos de judía se realizó utilizando el producto comercial RNeasy Mini Kit[®] (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante:

1. Triturar 100 mg de nódulos con nitrógeno líquido.
2. Adicionar 100 μl de una solución de lisozima obtenida disolviendo 4 mg/ml en tampón TE. Mezclar mediante vortex e incubar a temperatura ambiente durante 5 minutos.
3. Adicionar 350 μl de solución de lisis RLT[®] a la que previamente se le había adicionado 10 μl de β -mercaptoetanol. Mezclar por inversión manual.
4. Centrifugar 2 minutos a 12.000 rpm y recoger el sobrenadante.
5. Adicionar 250 μl de etanol absoluto y mezclar por inversión manual.
6. Adicionar la solución a una columna de purificación[®], colocarla sobre un tubo de microfuga y centrifugar a 12.000 rpm durante 30 s. Eliminar el sobrenadante.
7. Lavar la columna de purificación dos veces con 500 μl del tampón RPE[®] mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 30 s. Eliminar el sobrenadante cada vez.
8. Centrifugar 2 minutos a 12.000 rpm con la columna vacía.
9. Colocar la columna de purificación en nuevos tubos de microfuga y adicionar 30 μl de agua libre de ARNasa (DEPC). Incubar durante 1 minuto a temperatura ambiente para hidratar la resina. Centrifugar a 12.000 rpm durante 1 minuto.
10. Cuantificar el ARN obtenido (ver apartado 4.2).
11. Guardar a - 80°C hasta su empleo.

Durante la obtención y manipulación del ARN se ha utilizado material exclusivo para este propósito, previamente tratado con agua DEPC (dietilpirocarbonato). Todas las manipulaciones se han realizado en un cuarto especial habilitado para estas técnicas en la Estación Experimental del Zaidín, CSIC (Granada).

El ARN obtenido se sometió a tratamiento con DNAasa (Invitrogen). La ausencia de ADN se comprobó mediante amplificación de la muestra utilizando uno de los cebadores correspondientes.

3.12.2. Síntesis de cDNA

La síntesis del cDNA correspondiente al ARN aislado se llevó a cabo mediante el sistema comercial (Invitrogen) siguiendo el protocolo suministrado por el proveedor.

1. Preparar la mezcla de reacción que se indica a continuación:

Productos	Volumen de reacción
RNA	500 ng
dNTPs [®]	1 μ l
Random primers [®] (500 μ g/ml)	1 μ l
H ₂ O DEPC	Hasta 12 μ l
Volumen final	12 μ l

2. Incubar a 65°C durante 5 minutos. Colocar en hielo inmediatamente.
3. A cada tubo eppendorf, adicionar:
 - 4 μ l de 5x First-Strand Buffer[®]
 - 2 μ l de 0,1 M DTT
 - 1 μ l de RNase Inhibitor[®]
4. Mezclar e incubar a 25 °C durante 2 minutos.
5. Adicionar 1 μ l de SuperScript II retrotranscriptasa[®], mezclar por inversión e incubar a 42 °C durante 50 minutos. Detener la reacción incubando a 70 °C durante 15 minutos.
6. Guardar a -20°C hasta su empleo.

3.12.3. Amplificación del gen *PvSSn*

La amplificación del gen *PvSSn* se llevó a cabo utilizando los cebadores FwSSPv y RvSSPv descritos por Silvente et al. (2003). Como control se llevó a cabo la amplificación del gen *PvActin* mediante los cebadores FwActinPv y RvActinPv (Valdéz-López et al. 2008).

Cebadores	Secuencias	Tamaño estimado del fragmento que amplifica
FwActinPv	5'-GTATGTTGCCATTCAGGCCGTTCTTTCTCT-3'	150 pb
RvActinPv	5'-CGACCCGCAAGATCAAGACGAAGGA-3'	
FwSSPv	5'-GCACAGTGCCTCCTGAAACC-3'	500 pb
RvSSPv	5'-CTTGAGATCCACTTGCGAAC-3'	

La mezcla de reacción utilizada fue:

Concentración inicial	Volumen de reacción (µl)
Tampón 10X	2,5
MgCl ₂ (50 mM)	1,5
dNTPs (10 mM)	0,5
DSMO	1,5
Primers (5 µM)	1,25
<i>Taq</i> polimerasa (5U/µl)	0,2
ADNc	1-2 µl
Agua bidestilada estéril	Hasta 25 µl
Volumen total	25 µl

La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf MasterCycler) mediante el siguiente programa:

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo	
1	96	5 min	Desnaturalización inicial
30	96	1 min	Desnaturalización
	60	30s	Hibridación de las cadenas de ADN y unión de los cebadores (“annealing”)
	72	1 min	Elongación
1	72	7 min	Elongación final

El producto de la amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2 % utilizando las condiciones descritas en el apartado 4.3.1. Como marcador de peso molecular se empleó un marcador de 100-1000 pares de bases (Dominion MBL).

La cuantificación y análisis de los diferentes transcritos se realizó mediante el programa informático Quantity One (Biorad).

3.12.4. Análisis estadístico

El número de réplicas se especifica en las leyendas de las figuras o pies de las tablas. Para cada grupo de medidas se calculó la media y su correspondiente error estándar (ES). En los resultados del estudio de la sequía y salinidad en nódulos de judía se compararon las medias de cada tratamiento con el control mediante análisis ANOVA y el *t*-test de Tukey ($P < 0,05$) utilizando el programa SPSS 11.0.

4. RESULTADOS

4.1. TRABAJO I

***Burkholderia phymatum* capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils**

C. Talbi¹, M. J. Delgado¹, L. Girard², A. Ramírez-Trujillo², J. Caballero-Mellado² and E. J. Bedmar¹

¹Department of Soil Microbiology and Symbiotic Systems, Estación Experimental del Zaidín, CSIC. P.O. Box 419, 18080-Granada, Spain

²Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ap. Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, 62271, México.

Manusrito publicado en: *Applied and Environmental Microbiology*. 76: 4587–4591

4.1.1. Abstract

Phylogenetic analysis of 16S rRNA, *nodC* and *nifH* genes of four bacterial strains isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris* grown in Morocco soils were identified as *Burkholderia phymatum*. All four strains formed N₂-fixing nodules on *P. vulgaris* and *Mimosa*, *Acacia* and *Prosopis* species, and reduced acetylene to ethylene when cultured *ex planta*.

4.1.2. Introduction

Until 2001 all known bacteria involved in root nodule symbioses with leguminous plants were classified as members of the order *Rhizobiales* of the Alphaproteobacteria, including *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* (Sawada et al. 2003, Willems et al. 2006, Zakhia et al. 2006). Moulin et al. 2001, however, described two *Burkholderia* nodule-forming strains isolated from *Machaerium lunatum* in French Guiana and *Aspalathus carnosus* in South Africa, respectively, this being the first report on the presence of a betaproteobacterium within root nodules of legumes. Later, the strains were formally classified as *Burkholderia phymatum* STM815^T and *Burkholderia tuberum* STM678^T, respectively (Vandamme et al. 2002). *Burkholderia* species are the predominant isolates from nodules of mimosoid legumes from Panama (Barrett et al. 2005), Costa Rica (Barrett et al. 2006), Taiwan (Chen et al. 2003, 2006), Brazil (Chen et al. 2005, 2007), Venezuela (Chen et al. 2005), and Madagascar (Rasolomampianina et al. 2005), which indicates a high affinity of *Burkholderia* to form effective symbioses with *Mimosa*. Diazotrophy is well represented in *Burkholderia*; among the more than 55 species presently classified as *Burkholderia*, 9 have been shown to fix N₂ *ex-planta* by using either the acetylene reduction activity (ARA) assay or the presence of *nifH* genes encoding nitrogenase reductase (Barrett et al. 2006, Chen et al. 2005, Elliott et al. 2007, Rasolomampianina et al. 2005), and more recently by ¹⁵N₂ isotopic dilution experiments (Martínez-Aguilar et al. 2008).

Common bean (*Phaseolus vulgaris*) is an herbaceous leguminous plant which establishes N₂-fixing symbiosis with, at least, 5 species of the genus *Rhizobium*. *Rhizobium etli* is the predominant species in America (Segovia et al. 1993), and is also detected in Europe and Africa (Herrera-Cervera et al. 1999, Mhamdi et al. 2002). *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* is commonly found in Europe (Herrera-Cervera et al. 1999), and has also been reported to be present in Tunisia (Mhamdi et al. 2002) and

Colombia (Eardly et al. 1995). *R. tropici* is found in acid soils of South America and is also present in Europe and several African countries (Martínez-Romero et al. 1991). *R. giardinii* has been detected only in European and Tunisian soils (Amarger et al. 1997, Mhamdi et al. 2002), and *R. gallicum* has been found nodulating beans in Europe, North Africa and Mexico (Amarger et al. 1997, Herrera-Cervra et al. 1999). In this study we report on the isolation and characterization of *B. phymatum* from root nodules of *P. vulgaris* grown in alkaline soils from Morocco. Our results show that strains formed effective nodules on species of *Mimosa*, *Acacia* and *Prosopis*, and fixed atmospheric N₂ under free-living conditions.

4.1.3. Material and methods

Soil was taken from a field near Oulade Mansour (34° 47' N, 2° 15'W, Oujda province, Morocco) where maize and common bean have traditionally been grown as rotational crops without N-fertilization. Soil had a sandy-clay texture and the following characteristics: pH (in water) 8.1; 55.18% sand; 17.17% silt; 27.65% clay; 6.1% carbonates; 7.69% organic carbon; 0.069 total nitrogen. Seeds of *P. vulgaris* cv. Flamingo were surface-sterilized (96% ethanol for 30 seconds followed by immersion in 15% v/v H₂O₂ for 8 min), washed several times with sterile water, germinated in the dark, and planted in 1-kg pots containing soil and sterile sand (1:1 v/v). Plants were grown for 30 d in controlled environmental chambers under conditions previously described (Delgado et al. 1989). Nodules were collected, pooled together, surface-sterilized with 2.5% HgCl₂ for 5 min, and rinsed thoroughly with sterile distilled water. Then, 12 nodules were placed independently on Petri dishes and crushed in a drop of sterile water with a sterile glass rod. The resulting suspension was streaked onto Petri dishes containing either yeast extract-mannitol (YEM) medium (Vincent et al. 1970) or peptone-mineral salts-yeast extract (PSY) medium (Regensburger et al. 1983). After incubation of the plates at 30 °C for 7 d, CFU which represented all of the colony types that could be distinguished by microscopic observation of living cells were chosen. After identification, *Burkholderia* strains were routinely grown in BAc medium (Estrada-de los Santos et al. 2001).

For DNA extraction and PCR amplifications, genomic DNA was isolated from bacterial cells using RealPure Genomic DNA Extraction kit (Durviz, Spain) following the manufacturer's instructions. Repetitive extragenic palindromic (REP) fingerprint was performed using primers REPIR-I and REP2-I according to de Bruijn, 1992. PCR

amplifications of the 16S rRNA gene fragments were done with the Bphym-F and Bphym-R species-specific primer pair (Wong-Villareal et al. 2010).

4.1.4. Results and discussion

After isolation from root nodules, 52 strains forming morphologically different colonies were obtained and grouped in two main clusters after REP-PCR fingerprinting (data not shown), a technique that is extensively used to group bacteria at subspecies or strain level (de Bruijn, 1992; Versalovic et al. 1998), and has proven to be a powerful tool for studies in microbial ecology and evolution (Ishii et al. 2009). The nearly complete sequence of the 16S rRNA gene from a representative strain of each REP-PCR group was obtained and compared with those held in GenBank. Forty six strains in cluster I were members of the family *Rhizobiaceae* from α -Proteobacteria. Other 4 strains, hereafter referred to in the text as GR strains (GR01 to GR04), grouped in cluster II and were classified into the family *Burkholderiaceae* within the betaproteobacteria. The remaining two strains have not been clearly classified as yet. The four GR strains have almost identical 16 rDNA sequence, and BLAST searches showed they were phylogenetically close (99% identity) to *B. phymatum* STM815^T, a strain originally isolated from the papilionoid legume *Machaerium lunatum* (Moulin et al. 2001, Vandamme et al. 2002). A phylogenetic analysis including 30 *Burkholderia* reference strains showed that strains from root nodules of *P. vulgaris* form a tight cluster with *B. phymatum* STM815^T (Fig. 1).

The *nodC* gene was amplified with the primers pairs and conditions previously described (Elliott et al. 2007). Amplification of the *nodC* gene from each GR strain yielded a DNA fragment of about 0.4 kb (data not shown) whose nucleotide sequence was identical for all the four strains, and showed 99% identity to those of *B. phymatum* strains STM815^T and NGR195A (Elliott et al. 2007). A phylogenetic tree inferred from NodC sequences from *B. phymatum* strains and members of the order Rhizobiales is shown in Fig. 2. Primers IGK (Poly et al. 2001) and NDR-1 (Valdés et al. 2005) were used for amplification of the *nifH* genes as indicated earlier (Perin et al. 2006). PCR amplifications of the *nifH* gene and further sequencing from each GR strain revealed that they all had almost identical DNA sequence, which were 99% identical to those of *B. phymatum* STM815^T and NGR195A (Elliott et al. 2007). A phylogenetic tree based on NifH sequences showing the relationships between *B. phymatum* and other *Burkholderia* and rhizobial species is shown in Fig. 3.

For nodulation tests, seeds of *Glycine max*, *Cicer arietinum*, *Pisum sativum*, *Lens culinaris*, *Lotus corniculatus*, and *Medicago sativa* were surface sterilized as described above for common beans. Seeds of *Mimosa*, *Leucaena*, *Prosopis* and *Acacia* were surface-sterilized with concentrated sulfuric acid for 10 min followed by 3% sodium hypochlorite for 10 min, and then washed thoroughly with sterile water. Plant cultivation was carried out as indicated above. Acetylene reduction activity (ARA) by nodulated plants was assayed on detached root systems excised at the cotyledonary node as previously described (Mesa et al. 2004).

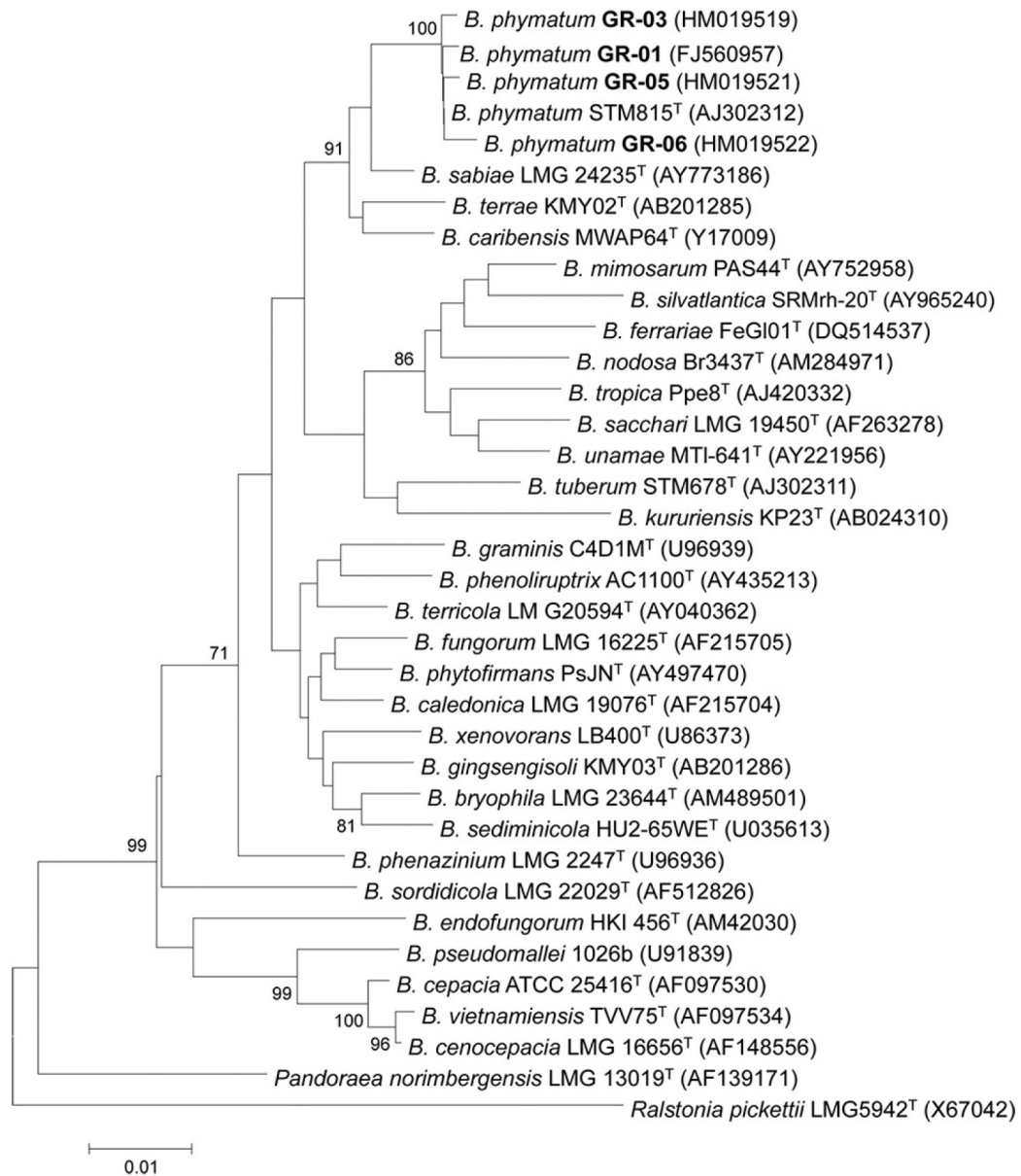


Figure 1. Phylogenetic tree showing the positions of four *P. vulgaris* isolated strains, GR01, GR03, GR05, and GR06, within the genus *Burkholderia* based on 16S rRNA gene sequence comparisons. One thousand bootstrap samplings were performed. The NCBI GenBank accession number for each strain is shown in parentheses. The bar represents one nucleotide substitution per 1,000 nucleotides. The multiple alignments of the sequences were performed with CLUSTAL W software (Thompson et al. 1994). The tree topology was inferred by the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987), based on 1,310 DNA sites, and the distance matrix method was performed according to the method of Jukes and Cantor (Jukes and Cantor, 1969) using the program MEGA version 2.1 (Kumar et al. 2001).

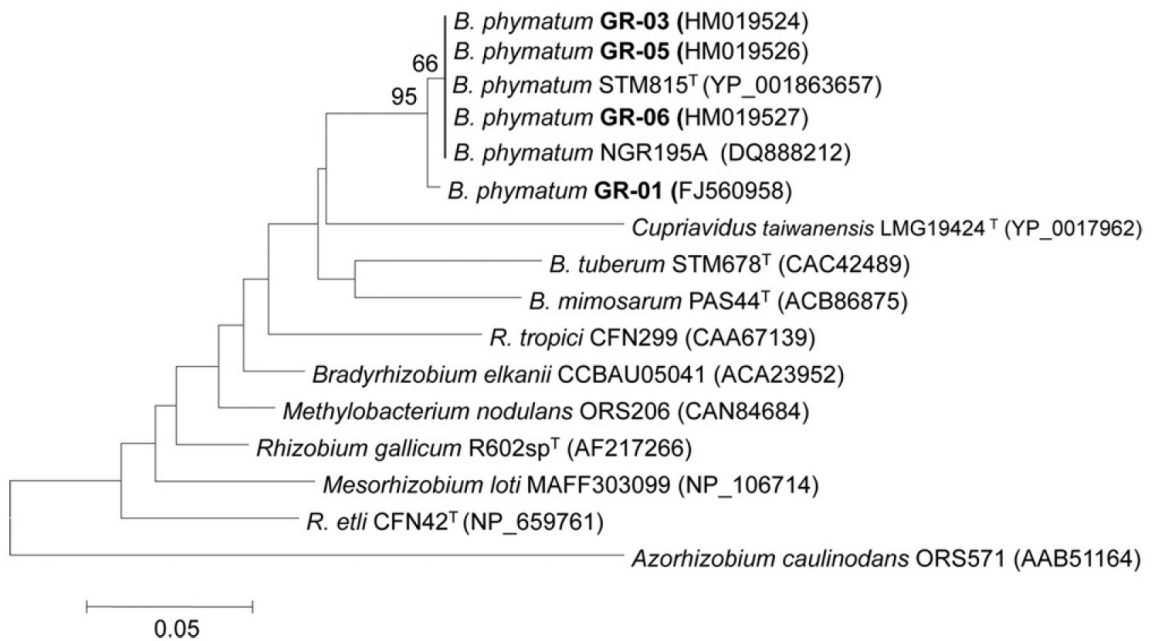


Figure 2. Phylogenetic tree inferred from NodC sequences shows the positions of four *P. vulgaris*-isolated strains, GR01, GR03, GR05, and GR06, within the genus *Burkholderia*. The tree topology was inferred by the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) based on 195 sites. The bar represents the number of amino acid substitutions per site. One thousand bootstrap samplings were performed. The NCBI GenBank accession number for each strain is shown in parentheses.

The GR strains are true symbionts of *P. vulgaris* as, after nodule isolation, they were able to establish new effective symbiosis with common beans, with values of ARA ranging from 492 to 525 $\mu\text{mol ethylene/plant/h}$. *B. phymatum* STM815^T also infected *P. vulgaris*, but the efficiency of the symbiosis, determined as plant dry weight (1.06 ± 0.18 g/plant/h), was half of that found in plants nodulated by the GR strains. These strains also nodulated *M. pigra*, *A. cochliacantha*, *A. bilimeki*, *L. glauca* and *P. laevigata*, but were unable to form nodules on *P. sativum*, *L. culinaris*, *L. corniculatus*, *M. sativa*, *G. max* and *C. arietinum*.

Diazotrophy is common among *Burkholderia* species as shown recently by N₂ isotopic dilution studies (Martínez-Aguilar et al. 2008). Under free-living conditions, ARA by the GR strains was tested in semisolid JMV medium as indicated earlier (Reis et al. 2004). At the end of the experiments the culture purity was routinely checked by plating to verify uniform colony morphology. Like strain STM815^T, strains isolated from *P. vulgaris* also had nitrogenase activity when grown *ex planta*. Values of activity, however, were about half of that detected in strain STM815^T (83 ± 15 nmol C₂H₄/h).

Preparation of whole-cell proteins and sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) assays were performed as described previously (Estrada-de los Santos et al. 2001). Protein profiles were compared with type and reference strains of legume-nodulating *Burkholderia*. *P. vulgaris*-isolated strains showed almost identical SDS-PAGE protein profiles (evaluated by visual comparison) to those from type strain of *B. phymatum* STM815^T, but clearly different to those of other legume-nodulating *Burkholderia* species (Fig. 4). No differences were found when API 20 NE and API 50 CH strips were used to check for differences in nitrogen and carbon sources between *B. phymatum* STM815^T and the GR strains (data not shown).

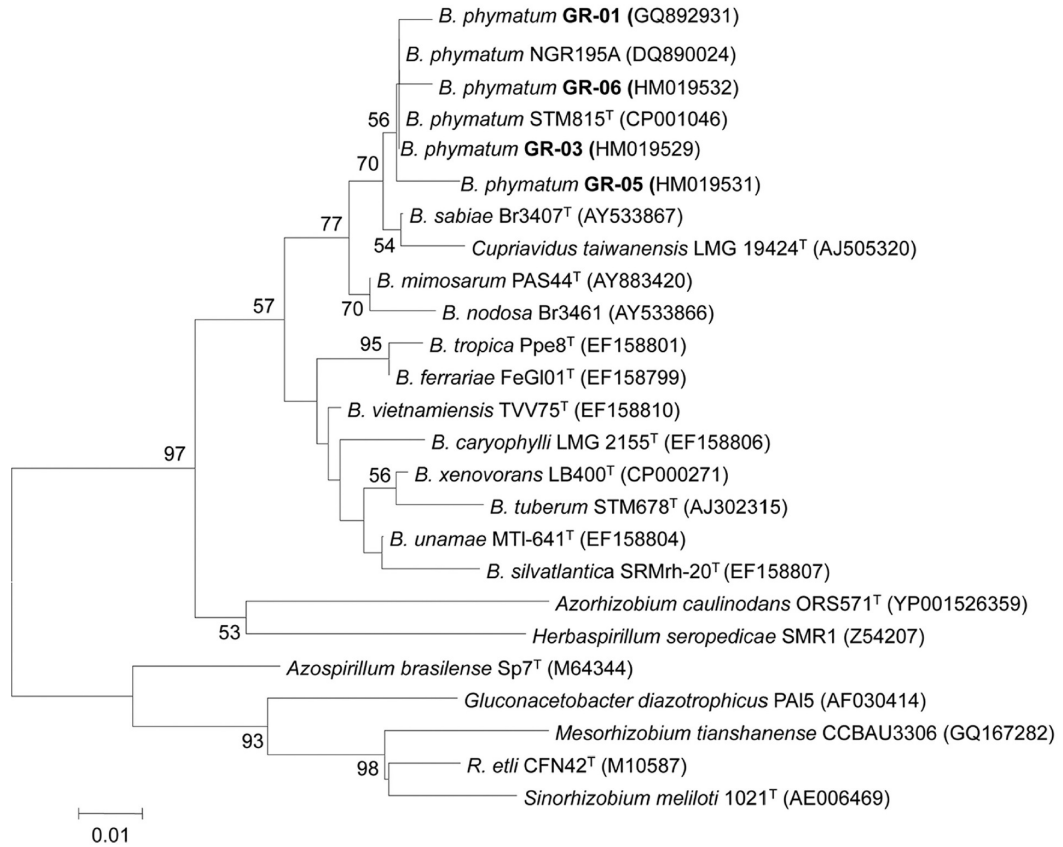


Figure 3. Phylogenetic tree inferred from NifH sequences shows the positions of four *P. vulgaris*-isolated strains, GR01, GR03, GR05, and GR06, within the genus *Burkholderia*. The tree topology was inferred by the neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) based on 195 sites. The bar represents the number of amino acid substitutions per site. One thousand bootstrap samplings were performed. The NCBI GenBank accession number for each strain is shown in parentheses.

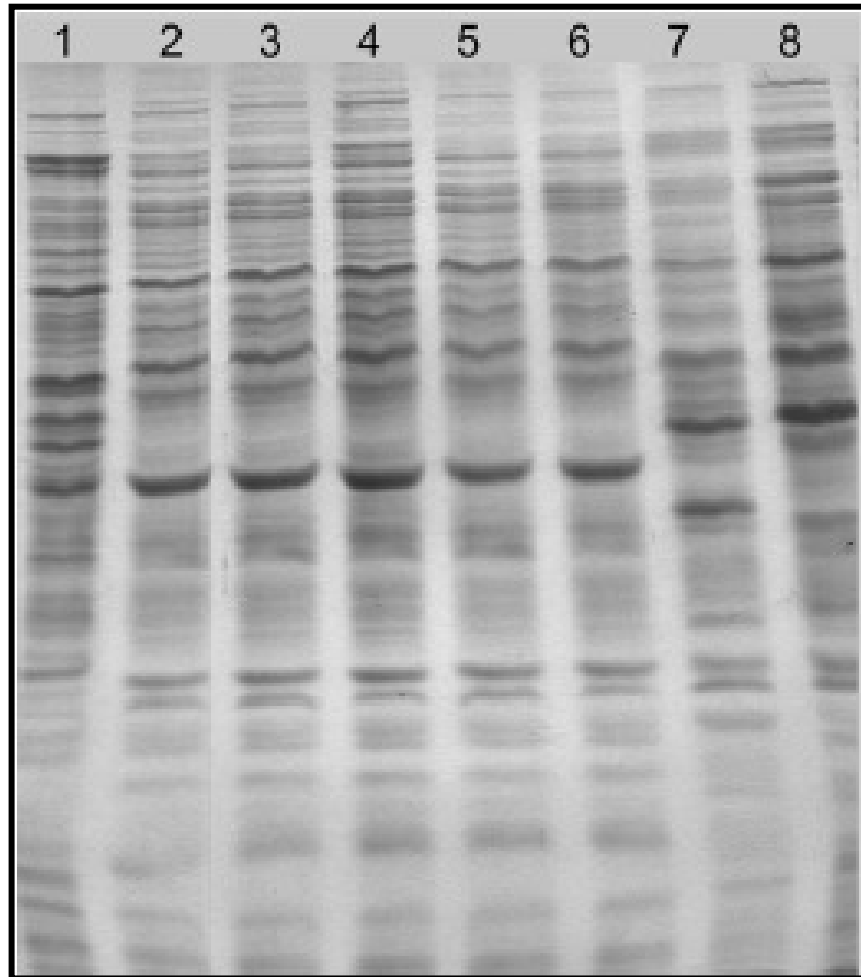


Figure 4. Protein electrophoregrams (SDS-PAGE) of *P. vulgaris* isolated strains and type strains of known legume-nodulating *Burkholderia* species. Lane 1, *B. tuberum* STM678T; lane 2, *B. Phymatum* STM815T; lanes 3 to 6, *B. phymatum* GR01, GR03, GR04, and GR06, respectively; lane 7, *B. mimosarum* PAS44T; lane 8, *B. nodosa* Br3437T.

Based on 16S rRNA gene sequences and protein profiles, which provide strong evidence for the delineation of bacterial species (Vandamme et al. 1996), the *Phaseolus*-isolated strains could be assigned to the species *B. phymatum*. Moreover, analysis of the phylogenetic relationships of such sequences and other *Burkholderia* species showed they formed a robust clade with *B. phymatum* STM815^T. In addition, sequencing of the *nodC* and *nifH* genes revealed the phylogenetically closest bacterial species was *B. phymatum* STM815^T. All these results support affiliation of *Phaseolus*-isolated strains as *B. phymatum*. Since genomic DNA from the GR strains had the same DNA band pattern after REP-PCR fingerprinting, and extremely similar 16S rRNA and *nifH* gene sequences, as well as identical *nodC*, the four strains could be derived from a same clone. Our results also suggest that strains of *B. phymatum* isolated from *Mimosa* and *Phaseolus* have acquired their symbiosis genes either from a common ancestor or by lateral transfer between them, the direction of transfer being unknown. Although limited to three isolates, strains NGR114 and NGR195A from *M. invisa* and *M. pudica* in Papua New Guinea, respectively (Elliott et al. 2007), and STM815^T from *M. lunatum* in French Guiana (Moulin et al. 2001, Vandamme et al. 2002), and four strains from *P. vulgaris* in Morocco, our results raise questions concerning the biogeographical, environmental and host taxa distribution of *B. phymatum* nodule symbionts. *B. phymatum* was originally discovered in nodules from *M. lunatum* in French Guiana, and most other strains in this lineage have been found associated with host legumes in the genus *Mimosa*, primarily in the Neotropics. Thus, the current results extend both the know host distribution and geographic range of this group of nodule symbionts. Whether *B. phymatum* is prevalent on rhizobial species within nodules of *P. vulgaris* in the geographic site where soil samples were taken cannot be elicited from the present results. Accordingly, it will be important in future work to survey additional sites both within the native geographic range and elsewhere to understand the consistency on the association between *Phaseolus* and *Burkholderia*.

4.1.5. Acknowledgments

This study was supported by ERDF-cofinanced grant CGL2006-06870 from Ministerio de Ciencia e Innovación, CVI-3177 and RNM-4746 from Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía, grant 107PICO312 from Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED), and 2005MX0032 from CONACYT/CSIC. We are grateful to L. Martínez-Aguilar (CCG-

UNAM) for technical assistance in PCR and SDS-PAGE assays, and P. Estrada-de los Santos (CCG-UNAM) for performing phylogenetic trees based on 16S rRNA, *nodC* and *nifH* genes.

4.2. TRABAJO II

***Burkholderia phymatum* improves salt tolerance of symbiotic nitrogen fixation in
*Phaseolus vulgaris***

Talbi C¹, Argandoña M², Bedmar EJ¹ Salvador, M². Vargas C² and Delgado MJ¹

¹Estación Experimental del Zaidin, CSIC, P. O. Box 419, 18080-Granada, Spain.

²Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Sevilla, Spain.

4.2.1. Abstract

Burkholderia phymatum is a recently reported common bean symbiont isolated from nodules of plants grown in semi-arid soils in Morocco. Osmotolerance of *B. phymatum* GR01N under free living and in symbiotic association with *Phaseolus vulgaris* has been investigated in this work. The strain showed increased tolerance to osmotic stress under free-living conditions compared to the reference strain *Rhizobium tropici* CIAT899. As previously reported in *R. tropici* CIAT899, *B. phymatum* GR01N accumulated the disaccharide trehalose in response to saline stress. In addition, mannitol (most probably taken up from the external medium) and the amino acid alanine were also identified in *B. phymatum* GR01N cell extracts. Under conditions of saline stress, *P. vulgaris* plants nodulated by *B. phymatum* GR01N showed increased plant dry weight and nitrogen fixation, if compared to those inoculated with *R. tropici* CIAT899R. Nodule competition assays revealed that *B. phymatum* GR01N presented higher rates of nodule occupancy than *R. tropici* CIAT899R in *P. vulgaris* plants grown under saline conditions. These results were confirmed by fluorescence detection, in nodules, of *B. phymatum* GR60 expressing green fluorescence protein, and of *R. tropici* CIAT61, expressing red fluorescence protein. Results from this work indicate that *B. phymatum* GR01N, isolated from common bean nodules grown in semi-arid soils in Morocco, is a good candidate for inoculation of common bean in saline soils.

4.2.2. Introduction

Members of the Leguminosae, comprising 17.000 to 19.000 species, play an important ecological role, with representatives in nearly every type of plants on Earth (Martínez-Romero and Caballero-Mellado, 1996). Together with the actinorhizal plants, legumes are well characterized by their ability to establish N₂-fixing symbiotic associations with soil bacteria. During this process, an exchange of molecular signals occurs between the two partners, leading to the formation of the root nodules, where nitrogen fixation takes place (Graham, 2008). Until 2001 all known bacteria involved in root nodule symbioses with legume plants were classified as members of the order Rhizobiales of the Alphaproteobacteria, including the genera *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* (Graham, 2008). In 2001, Moulin and colleagues showed the presence of *Burkholderia* in nodules of *Aspalathus carnosa*, this being the first report on the presence of a Betaproteobacteria within root nodules of legumes. Gammaproteobacteria of the genus *Pseudomonas* have

also been shown to nodulate *Robinia pseudoacacia* (Shiraishi et al. 2010). In fact, PCR amplification revealed the presence of symbiotic genes in *Burkholderia* and *Pseudomonas* species which might acquire their nodulation genes through horizontal gene transfer from rhizobia species. However, nitrogen fixation abilities of these isolates are yet to be defined.

Nearly 40% of the world's land surface can be categorized as arid and semi-arid ecosystems often located in developing countries where abiotic stresses such as salinity or drought limit legume crop production (Zahran 1999, 2009). Most crops are sensitive to relatively low levels of salinity (Tuteja, 2007). In the rhizobia-legume symbiosis, not only the plant but also the bacteria are sensitive to salinity both at the free-living stage and during symbiosis, being this process more sensitive to salt or osmotic stress than free-living rhizobia. Salinity affects the initial steps of the symbiotic interaction (root colonization, nodule infection and nodule development) (Tu, 1981; Zahran and Sprent, 1986; Zahran, 1999; Bouhmouche et al. 2005), as well as the nitrogen fixation activity per unit weight of nodules (Delgado et al. 1993, 1994; Baker et al. 1995; Shamseldin and Werner, 2005; Aydi et al. 2008). Many reports have shown that tolerant strains are symbiotically more efficient than salt-sensitive strains when they are used as inoculants of legumes grown under saline conditions (Miller-Williams et al. 2006; Dominguez-Ferreras et al. 2009a, Nogales et al. 2002). For this reason, selection of adapted strains of rhizobia to salinity is a promising strategy for improvement of legumes growth under such constraint.

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is an herbaceous leguminous plant domesticated independently in ancient Mesoamerica and the Andes. This plant was exported to the rest of the world starting in the early 16th century and is now an important staple crop in the diets of people of Latin America, Asia, Africa, and other regions of the developing world (Gepts 1990; Gepts and Gliss, 1988). At least five rhizobial species nodulate and fix nitrogen with beans, including *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli*, *R. gallicum*, *R. giardinii* and *R. tropici* (Graham, 2008). Among them, *R. tropici* CIAT899 has been shown to tolerate several abiotic stresses, including high temperature, low pH or salinity (Martínez-Romero et al. 1991; Graham et al. 1994; Riccillo et al. 2000; Nogales et al. 2002). Moreover, genes of *R. tropici* CIAT899 involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *P. vulgaris* (Nogales et al. 2002).

The genus *Burkholderia* belongs to the Betaproteobacteria class and includes species that colonize a wide diversity of niches, ranging from soil and water to plants and animals (Coenye and Vandamme 2003). Several diazotrophic plant-associated *Burkholderia* species are able to colonize the rizosphere and/or the endophytic environment of a wide range of host plants (Gillis et al. 1995; Reiss et al. 2004; Goris et al. 2004; Perin et al. 2006a,b; Caballero-Mellado et al. 2004, 2007). In addition, five legume-nodulating N₂-fixing strains were isolated mainly from nodules of the genistoid tropical legume *Mimosa* spp. (Vandamme et al. 2002; Caballero-Mellado et al. 2004; Chen et al. 2006, 2007, 2008). Today, it is clearly established that *Burkholderia* is the most competitive symbiont of *Mimosa* (Elliot et al. 2009) and that *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes (Bontemps et al. 2010).

Despite common bean is a promiscuous legume able to form symbiosis with a number of rhizobial species, it is considered as a poor nitrogen fixer, if compared to other grain legumes (Hardarson et al. 1993; Ramos et al. 1987). This problem has been attributed to the ineffectiveness of indigenous rhizobia (Graham, 1981) or to environmental constraints. In a recent work, we isolated *B. phymatum* strain GR01 from root nodules of common bean plants grown in semi-arid soils in Morocco (Talbi et al. 2010). In order to be able to propose this new isolate as an efficient inoculant of *P. vulgaris*, in this work, we have compared the capacity of *B. phymatum* GR01 with that of the reference strain *R. etli* CIAT899 to tolerate an osmotic stress under free living conditions and to establish an efficient nitrogen-fixing symbiosis with *P. vulgaris* plants under salt stress.

4.2.3. Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

B. phymatum GR01N, a nalidixic acid resistant derivative of *B. phymatum* strain GR01 (Talbi et al. 2010), and CIAT899R, a rifampicin-resistant derivative of *Rhizobium tropici* CIAT899 (Martínez-Romero et al. 1991) were used in this study. Bacteria were routinely grown on tryptone-yeast extract-calcium chloride medium (TY, Beringer 1974) at 30 °C. Antibiotics used for rhizobial strains were (µg/ml): nalidixic acid (50) and rifampicin (20), and for *E. coli* strains, gentamicin (10), chloramphenicol (50), and ampicillin (200).

The effect of salt on bacterial growth was tested in liquid M79 (Vincent 1970) supplemented with 0, 150, 300, 400, 500 or 600 mM NaCl. Salt tolerance tests on solid

medium were carried out by spot inoculation of 10-fold serial dilutions of each strain on agar- M79 plates containing NaCl concentrations mentioned above. Tolerance to hyperosmotic medium was determined by inoculation of each strain (10^8 cells/ml) in liquid M79 medium containing 150, 300, 400, 500 or 600 mM sucrose. Effect of pH on bacterial growth was determined as indicated earlier (Morón et al. 2005). Essentially, liquid M79 medium was buffered with 25 mM HOMOPIPES (pH 4.0-5.0), 40 mM MES (pH 5.5-6.7), 30 mM HEPES (pH 6.8-8.2), and 30 mM AMPD (pH 7.8-9.7) as biological buffers. The pHs were checked after autoclaving and did not change by more than ± 0.1 unit. For all experiments, cells were grown at 30 °C for 96 h. Growth was recorded every 12 h.

GFP- and DsRed-tagging

R. tropici CIAT899R and *B. phymatum* GR01N were cross tagged with GFP and DsRed fluorescent proteins by mating them with *E. coli* containing plasmids miniTn7(Gm) $P_{\text{rmb}} P_1\text{-}gfp\text{-}a$ and miniTn7(Gm) $P_{A1/04/03}$ *DsRedExpress*-a (Koch et al. 2001, Lambertsen et al. 2004). These plasmids were introduced into the recipients cells by triparental conjugation using plasmids pUX-BF13 (Bao et al. 1991) and pRK600 carrying the RP4/RK2 system (Kessler et al. 1992) as helpers. Cells resistant to gentamicin expressing fluorescent proteins were examined using a Leica M165FC stereo microscope equipped with epifluorescence detection. Cells were observed as fluorescent colonies on agar plates, or as single fluorescent cells on glass slides. Site specific tagging was analyzed by PCR from different colonies using primers Tn7-GlmS and Tn7R109 and PCR conditions as indicated earlier (Lambertsen et al. 2004). Four strains, *R. tropici* CIAT60 and *B. phymatum* GR60, containing plasmid miniTn7(Gm) $P_{\text{rmb}} P_1\text{-}gfp\text{-}a$, and strains CIAT61 and *B. phymatum* GR61, containing plasmid miniTn7(Gm) $P_{A1/04/03}$ *DsRedExpress*-a, were obtained that have been used in this study. DNA isolation, restriction enzyme digestions and agarose gel electrophoresis were performed according to standard protocols (Sambrook et al. 1989; Sambrook and Russell, 2004).

Inoculation of plants and growth conditions

Common bean (*Phaseolus vulgaris* cv. Flamingo) plants were surface-sterilized with 96% ethanol (v/v) for 30 s followed by immersion in 5% sodium hypochlorite for 5 min, washed thoroughly with sterile water, imbibed in water for 2 h, deposited on vermiculite seedbeds, and germinated in darkness at 30 °C. Seedlings were planted in autoclaved Leonard-type jar assemblies (Leonard 1943) containing vermiculite and N-free nutrient solution (Rigaud and Puppo 1975). For all experiments, plants were grown for 35 d in a controlled environmental chamber under conditions previously described (Delgado et al. 1989).

For nodulation competitiveness experiments, cells of *B. phymatum* GR01N and *R. tropici* CIAT899R were mixed (1:1 ratio, about 10^8 cells/ml each) and used to inoculate *P. vulgaris* plants which were grown in the absence or the presence of 25, 35 or 50 mM NaCl. For each treatment, two hundred nodules (25 nodules/plant) were collected, surface-sterilized with 0.25% HgCl₂ for 5 min, washed thoroughly with sterile water, crushed with a glass rod and streaked onto plates containing TY medium without antibiotics or supplemented with either nalidixic acid or rifampicin. Nodule occupancy was also checked by using fluorescence protein expression. For that purpose, seedlings of *P. vulgaris* were inoculated with a mixture (1:1 ratio) of *R. tropici* CIAT61 and *B. phymatum* GR60 (about 10^8 cells/ml each) and grown in the absence or the presence of 35 mM NaCl. Then, 20 nodules from each treatment were taken, washed with sterile distilled water, cut in two halves, submerged into a drop of sterile distilled water and, finally, mounted on a coverslip attached to homemade holders. Emission of fluorescence was inspected by confocal laser microscopy using a Nikon Eclipse TE2000-U microscope equipped with filter blocks with spectral properties matching those of GFP (488 nm excitation, 530 nm emission) or DsRed (543 nm excitation, 570nm emission) (Chen et al. 2003). Cross talk between the channels was also monitored. Emission of fluorescence was quantified using ImageJ 1.44 software program (Rasband 1997).

Preparation of cell extracts and analysis of major cellular solutes in *B. phymatum* GR01N

Cells were grown in 200 ml of liquid M79 minimal medium with 20 mM mannitol as a carbon source. The basal salinity of the M79 medium was 17 mM of NaCl. The osmotic strength of M79 was increased by addition of 200 mM final concentration of NaCl.

Growth was monitored by measuring the optical density at D.O 600 nm. Cells were grown up to late exponential/early stationary phase ($OD_{600} = 1$ to 1.2). Extraction of endogenous compatible solutes was performed according to García-Esteba et al. (2006). Essentially, cells were collected by centrifugation and washed with the same medium without any carbon source. The cell pellet was resuspended in 10 ml of extraction mixture (methanol:chloroform:water [10:5:4]) and incubated with gentle shaking for 30 min at 37 °C. Cell debris was removed by centrifugation, and supernatants were mixed once with chloroform:water (1:1) and freeze dried. For ^{13}C -nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy, dried extracts were resuspended in D_2O (0.5 ml). NMR spectra were recorded at 25°C on a Bruker AV500 spectrometer at 125 MHz as indicated earlier (Fernández-Aunión et al. 2010). The chemical shifts are reported in ppm on the δ scale relative to tetramethylsilane. Signals corresponding to trehalose, mannitol, and alanine were assigned by comparison with previously published chemical shift values (Smith et al. 1990) and confirmed by comparison with ^{13}C -NMR spectra of pure compounds.

Analytical assays

Leghaemoglobin (Lb) content was measured by fluorimetry as previously described (Sánchez et al. 2010). Plant dry weight and reduced tissue-N (Kjeldahl analysis) were determined on plant samples that had been heated at 60 °C for 48 h. All data were tested for significance using Tukey HSD test.

4.2.4. Results

Osmotolerance of *B. phymatum* free-living cells

To determine the osmotolerance of *B. phymatum* GR01N under free-living conditions, cells were cultured in M79 medium containing variable concentrations of NaCl (Fig. 1a,c) or sucrose (Fig. 1b). After incubation in liquid medium for 4 d, optical densities at 600 nm (OD_{600}) of cells of *B. phymatum* GR01N at 150, 300 and 400 mM NaCl were similar (0.89, 0.88 and 0.85, respectively) to that recorded when the cells grew in the absence of NaCl (0.95) (Fig. 1a). In contrast, growth of strain *R. tropici* CIAT899R significantly decreased with increasing salt concentrations showing about 29%, 50% and 93% reduction in values of OD_{600} in cells grown in the presence of 150, 300 and 400 mM NaCl, respectively, as compared with that achieved by cells grown without NaCl (Fig. 1a). Whereas growth was not observed when cells of CIAT899R

were cultured in the presence of 500 and 600 mM NaCl, some growth was observed for GR01N (Data not shown).

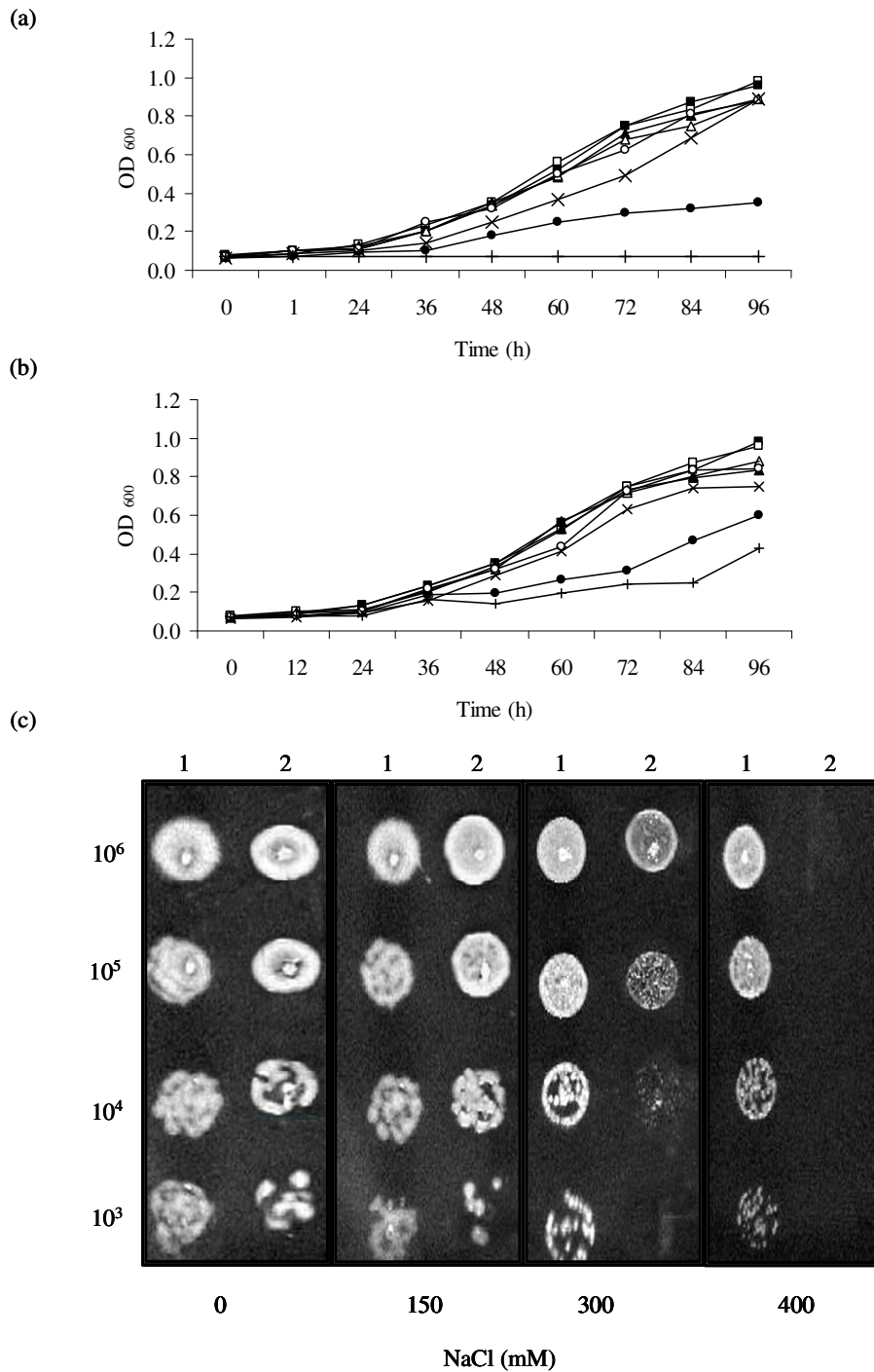


Figure 1. Growth of *B. phymatum* GR01N (open symbols) and *R. tropici* CIAT899R (filled symbols) in M79 minimal medium without (\square, \blacksquare), or with 150 mM ($\blacktriangle, \triangle$), 300 mM (\circ, \bullet), or 400 mM ($\triangleleft, \blacktriangleright$) of (a) NaCl, or (b) sucrose. Cells were grown in liquid M79 medium for 4 d at 30 °C. Data represent the mean of at least 3 replicates. (c) Serial dilutions of each strain spot inoculated on agar-M79 medium supplemented with different NaCl concentrations. In each row, drops contain approximately the number of CFU indicated at the left. 1. GR01N; 2. CIAT899R.

Cells of *R. tropici* CIAT899R also showed higher sensitivity to hyperosmotic medium than cells of *B. phymatum* GR01N. As shown in Fig. 1b, OD₆₀₀ of *B. phymatum* GR01N cells after 4 days growth was reduced about 7%, 12% and 21.0% when the liquid M79 medium was supplemented with 150, 300 or 400 mM sucrose, respectively, compared to the OD₆₀₀ observed when cells were grown in the absence of sucrose (Fig. 1b). A higher reduction of about 15%, 38% and 56% in OD₆₀₀ was observed after growth of *R. tropici* CIAT899R in the presence of 150, 300 or 400 mM sucrose, respectively, compared to that observed in the absence of sucrose (Fig. 1b).

The study of bacterial growth on solid M79 medium revealed interesting differences among *R. tropici* CIAT899R and *B. phymatum* GR01N. The lowest concentrations of osmolytes used (0 and 150 mM) had no significant differential effect on the growth of both strains. However, at higher NaCl concentrations (300 and 400 mM NaCl), we observed a higher tolerance of *B. phymatum* GR01N, if compared to *R. tropici* CIAT899R (Fig. 1c).

Identification of major intracellular solutes in *B. phymatum*

The differences in osmotic stress tolerance between *B. phymatum* GR01N and *R. tropici* CIAT899R cells prompted us to investigate the compatible solute content in both strains. By ¹³C-MNR, analysis, it has been previously demonstrated that *R. tropici* CIAT899R synthesises trehalose and glutamate as osmoprotectants in response to NaCl stress (Fernandez et al. 2010). Following a similar approach, in this work we have analysed *B. phymatum* GR01N cellular extracts from cells grown in the absence or the presence of NaCl. The ¹³C-MNR spectrum of *B. phymatum* GR01N grown in mannitol M79 medium with 200 mM NaCl contained three sets of resonances that could be assigned to the disaccharide trehalose (at 63.6, 71, 75, and 92 ppm), the sugar alcohol mannitol (at 66, 70.8 and 73 ppm), and the amino acid alanine (at 29 and 51.9 ppm) (Fig. 2, B). In contrast, trehalose was the only intracellular solute detected in extracts from cells grown in M79 medium without NaCl (Fig. 2, A). The identity of the three compatible solutes found in extracts of salt-stressed GR01N cells was confirmed by ¹H-NMR analysis (data not shown).

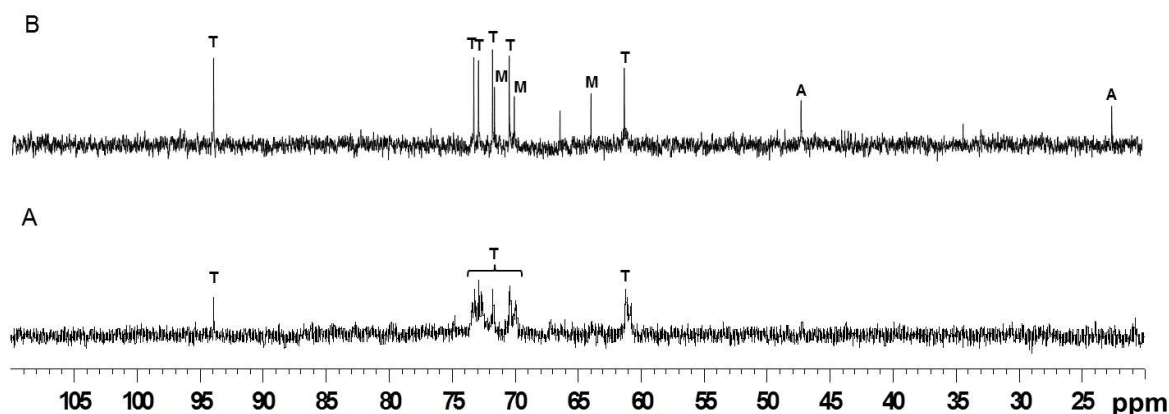


Figure 2. Analysis of major intracellular solutes in *B. phymatum* GR01N. Cells were grown in M79 minimal medium with 20 mM mannitol without NaCl (A) or supplemented with 200 mM NaCl (B). Cellular extract were analysed by ^{13}C -NMR. Resonances due to trehalose (T), mannitol (M), and alanine (A) are indicated.

Symbiotic effectiveness of *B. phymatum* under salt stress

The effect of salt stress on plant dry weight and nitrogen content of common beans inoculated with either *B. phymatum* GR01N or *R. tropici* CIAT899R is shown in Table 1. In the absence of NaCl, plants inoculated with any of the strains similar plant dry weight and nitrogen content. A significant decrease (about 25% compared to control plants) was observed in both dry weight and nitrogen content of plants that were inoculated with CIAT899R and grown in the presence of 25 mM NaCl (Table 1). However, this salt treatment did not affect growth and nitrogen content of plants inoculated with GR01N. After growth with 35 mM NaCl, a higher decrease in plant biomass and N content of about 41% and 39%, respectively, was observed in plants inoculated with CIAT899R compared to non-treated plants. By contrast, a slight decrease in these growth parameters corresponding to 13% and 15%, respectively, was observed in plants inoculated with GR01N that were treated with 35 mM NaCl, compared to control plants (Table 1). An estimation of nodule functionality was examined by analyzing Lb content (Table 1). Leghaemoglobin content in nodules formed by *R. tropici* CIAT899R diminished about 15% and 20% in plants grown in the presence of 25 mM and 35 mM NaCl, respectively, compared to control plants. However, these plant treatments did not significantly affect leghaemoglobin content of the nodules induced by *B. phymatum* GR01N (Table 1).

Table 1. Plant dry weight (PDW), plant nitrogen content [N] and nodule leghaemoglobin content (Lb) of *P. vulgaris* plants inoculated with either *B. phymatum* GR01N or *R. tropici* CIAT899R. Plants were grown for 35 d in N-free mineral solution supplemented or not with 25 and 35 mM NaCl. Values in a column followed by the same lower-case letter are not significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ (n=12).

Starin	NaCl (mM)	Parameter		
		PDW (g/plant)	[N] (mg/g plant)	Lb (mg/g FNW)
<i>R. tropici</i> CIAT899R	0	1.75 ± 0.1a	39.12 ± 1.1a	7.20 ± 0.8a
	25	1.31 ± 0.2b	29.50 ± 2.0b	6.13 ± 0.5b
	35	1.04 ± 0.2c	24.05 ± 1.9c	5.73 ± 0.3b
<i>B. phymatum</i> GR01N	0	1.73 ± 0.1a	39.42 ± 1.6a	7.13 ± 0.5a
	25	1.63 ± 0.2a	36.01 ± 1.2a	6.84 ± 0.2a
	35	1.51 ± 0.1b	33.72 ± 2.0b	6.54 ± 0.8a

Nodulation competitiveness of *B. phymatum* under salt stress

From 200 nodules taken from plants grown in the absence of NaCl, about 44% of them were formed by *B. phymatum* GR01N and 52% by *R. tropici* CIAT899R (Fig. 3). Similarly, non-significant differences of nodule occupancy were found when the nodules were collected from plants treated with 25 mM NaCl and inoculated with strains GR01 (45%) or CIAT899R (51%). However, the number of nodules occupied by cells of *B. phymatum* GR01N from plants treated with 35 or 50 mM NaCl outcompeted those of *R. tropici* CIAT899R since nodules formed by GR01N represented 66% and 76% of the total number of nodules taken from the plants grown with 35 or 50 mM NaCl, respectively (Fig. 3). Under all conditions examined, levels of co-occupation by strains GR01N and CIAT899R ranged between 3% to 5% of the total number of nodules collected from the plants (Fig. 3).

Emission of fluorescence by free-living cells of *B. phymatum* GR60 expressing GFP, encoded by the chromosome-cointegrated plasmid miniTn7(Gm) P_{tmB} P₁-*gfp*-a, and *R. tropici* strain CIAT61 expressing DsRed, encoded by the chromosome-cointegrated plasmid miniTn7(Gm)P_{A1/04/03} *DsRedExpress*-a, was detected by laser confocal microscopy. GFP-expressing bacteria appear green, and DsRed-expressing bacteria appear red (Fig. 4a, A). In nodules from plants co-inoculated with strains GR60 and CIAT61 that were not treated with salt, emission of fluorescence due to GFP and DsRed revealed that out of the 20 nodules analysed 42% and 50% of them were formed by strains GR60 and CIAT61, respectively (Fig. 4b). When plants were treated with 35 mM NaCl, nodules were formed mainly by cells of strain GR60 since emission of fluorescence due to GFP was observed in about 58% of total nodules and only 17% of the nodules emitted fluorescence due to DsRed (Fig. 4b). These results agree with those from nodulation competitiveness experiments showed in Figure 3 where 76% of the nodules from 35 mM NaCl-stressed plants were elicited by *B. phymatum* GR01N.

In plants not treated with salt, the percentage of nodules co-occupied by strains GR60 and CIAT61 was about 8%. In those nodules, emission of fluorescence due to GFP and DsRed was about 50% each (Fig. 4a,B), suggesting no differences in nodule co-occupation. Interestingly, in plants treated with 35 mM NaCl, the number of co-occupied nodules was about 25% (Fig. 4b). Under those conditions, 66% fluorescence emission was due to GFP (Fig. 4a,C), which indicates that nodule occupation was mostly due to strain GR60.

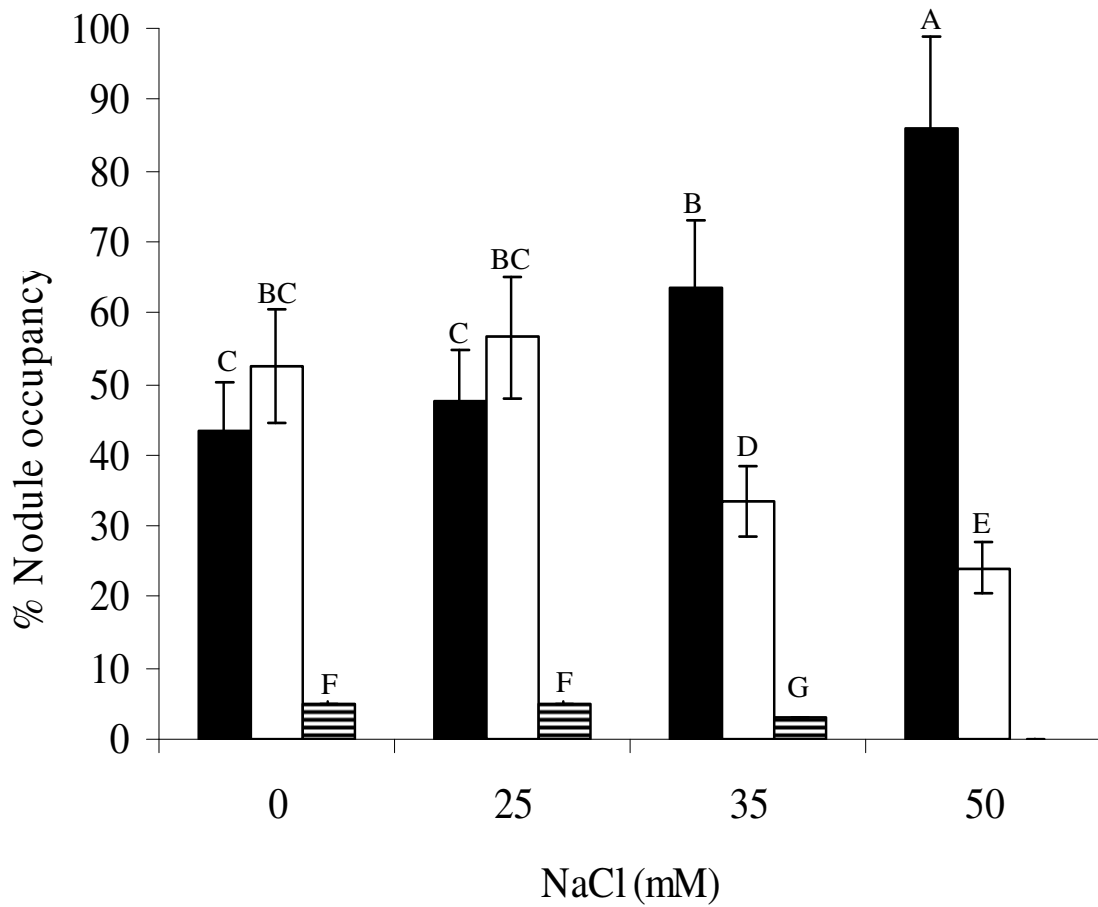


Figure 3. Nodulation competitiveness assays. Percentage of nodules formed by *B. phymatum* GR01N (black rectangles) and *R. tropici* CIAT988R (white rectangles) after co-inoculation (1:1 ratio) of *P. vulgaris*. Dashed rectangles indicate percentage of nodules co-occupied by strains GR01N and CIAT899R. Plants were grown for 35 d in N-free mineral solution supplemented or not with 25, 35 and 50 mM NaCl. Two hundred nodules were analysed per treatment. Bars correspond to standard deviation. Bars with different letters are significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ ($n = 4$).

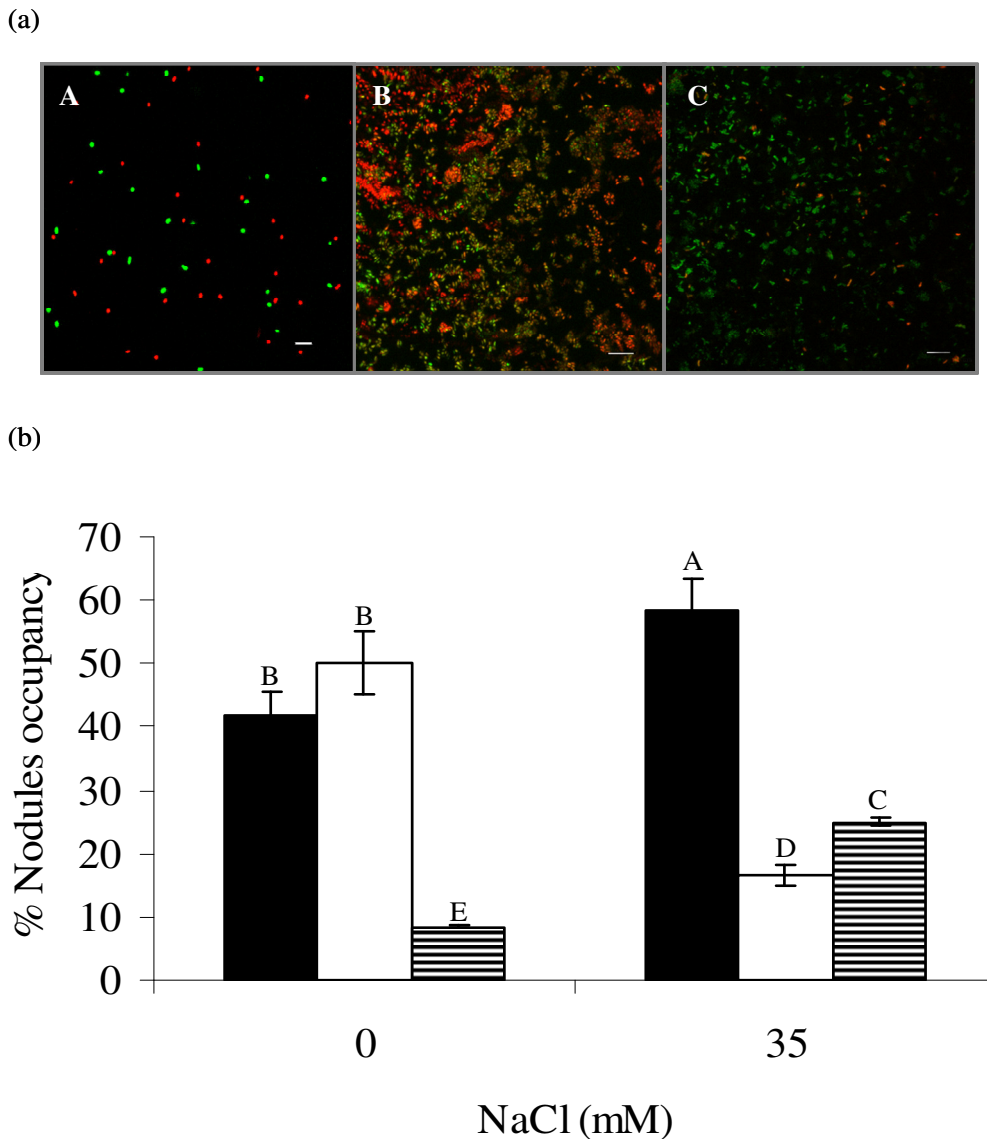


Figure 4. Detection of free-living and symbiotic mixed populations of bacterial cells. a) emission of fluorescence by free-living cells of mixed populations of *B. phymatum* GR60 expressing green fluorescent protein (GFP) and *R. tropici* strain CIAT61 expressing red fluorescent protein (DsRed) (a,A), and emission of fluorescence by cells inside nodules of *P. vulgaris* co-inoculated (1:1 ratio) with *B. phymatum* GR60 and *R. tropici* strain CIAT61 (a,B and C). (b) Percentage of nodules occupied by *B. phymatum* GR60 (black rectangles) or *R. tropici* CIAT61 (white rectangles) after co-inoculation (1:1 ratio) of *P. vulgaris*. Dashed rectangles indicate percentage of nodules co-occupied by strains GR60 and CIAT61. Plants were grown for 35 d in N-free mineral solution supplemented (a, C) or not (a, B) with 35 mM NaCl. Bars with different letters are significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ (n=3)

4.2.5. Discussion

The use of rhizobia tolerant to osmotic stress is a promising strategy to improve the symbiosis efficiency and legume production under salinity or drought stress (Zahran, 1999; Mhadhbi et al. 2008, 2011; Mnasri et al. 2007b; Ben Rhomdhane et al. 2007, Meuelenberg and Dakora, 2007). In this work, we have investigated the ability of *B. phymatum* GR01N to overcome high levels of osmotic stress conditions under free-living and symbiotic conditions. *R. tropici* CIAT899 is a Latin American effective microsymbiont of *Phaseolus vulgaris*. It has been reported to tolerate several abiotic stresses including salinity (Martínez-Romero et al. 1991; Nogales et al. 2002). However, under free-living conditions, *B. phymatum* GR01N is more tolerant than the reference strain *R. tropici* CIAT899R to an osmotic stress provoked by large concentrations of either salt or non-ionic solutes such sucrose in the medium.

One of the main mechanisms of bacterial adaptation to hyperosmotic conditions is the intracytoplasmic accumulation of compatible solutes such as sugars, polyols, amino acids and derivatives, betaines and ectoines (da Costa et al. 1998). They are taken from the environment or accumulated by *de novo* biosynthesis. As shown by ¹³C-NMR analysis, the response of *B. phymatum* GR01N to NaCl involved the accumulation of trehalose, mannitol, and alanine. As previously reported by Fernandez-Aunión et al. (2010), *R. tropici* CIAT899R synthesised only trehalose and glutamate as endogenous compatible solutes. The involvement of trehalose in the tolerance to osmotic stress has been widely reported in the literature. Thus, *Escherichia coli* (Strøm and Kaasen, 1993), *Sinorhizobium meliloti* (Domínguez-Ferreras et al. 2009b) and *Bradyrhizobium japonicum* (Sugawara et al. 2010) mutants lacking the *otsA* gene for the synthesis of trehalose are osmosensitive. Glutamate is a commonly used charge counterbalance for K⁺ influx in species from alphaproteobacteria (daCosta et al. 1998, Belitsky et al. 2001). Glutamate is not present in the extracts of *B. phymatum* GR01N. Instead, mannitol, and alanine were accumulated as a response to hyperosmotic stress. The accumulation of mannitol by *B. phymatum* GR01N might be due to an active accumulation from the external medium and could be considered as an osmoprotectant, rather than an endogenous compatible solute, for this strain. In general, uptake and accumulation of osmoprotectants is preferred over the synthesis of endogenous compatible solutes, as the latter is energetically more costly (Oren, 1999). In addition, it has been demonstrated that mannitol is rarely synthesized by bacteria as a compatible solute, but it is frequent to find it as an external osmoprotectant (daCosta et al. 1998).

Alanine has also been described as solute which is accumulated in response to osmotic stress in some *Burkholderia cenocepacia* strains (Behrends et al. 2011). However, at high salt levels, strains that accumulated the classic osmo-protectants trehalose and glycine-betaine were less impacted by osmotic stress than strains that increased the intracellular concentration of amino acids such as alanine, phenylalanine or glutamate. Thus, it has been suggested that the increased levels of these amino acids did not seem to confer any sort of tolerance to osmotic stress but they could be part of a generic stress response (Behrends et al. 2011). These findings, taken together, suggest that the ability of *B. phymatum* GR01N to survive at higher salt concentrations than *R. tropici* CIAT899R might be due to the combination of trehalose and mannitol, or to the accumulation of higher amounts of trehalose than *R. tropici* CIAT899R.

R. tropici CIAT899 has been described as a common bean-nodulating *Rhizobium* strain tolerant of acid pH (Graham et al. 1994, Martínez-Romero et al. 1991, Morón et al. 2005, and Vinuesa et al. 2003). Bacteria from the genus *Burkholderia* are considered to be typical from neutral pH environments (Liesack et al. 1997), but recent evidences suggest a high abundance of *Burkholderia* in acidic soils (Reis et al. 2004). *B. phymatum* GR01N was isolated from the rhizosphere and within nodules of *P. vulgaris* plant growing in Moroccan alkaline soils with about pH 8 (Talbi et al. 2010). In this work, we have confirmed that this strain is able to grow in alkaline environments (pH 8.5/9). Taken together, these results suggest that *B. phymatum* GR01N can be a good competitor for bean nodules occupancy in saline/alkaline environments.

We have also investigated the efficiency of *B. phymatum* GR01N as an endosymbiont of *P. vulgaris* under salt stress, a major constraint limiting legume production in arid and semi-arid regions. The negative effect of salinity on nodulation, competitiveness, nitrogen fixation and plant growth has been reported in many important grain legumes such as faba bean, common bean, chick pea and soybean (Zahran and Sprent, 1986; Dua, 1992, Delgado et al. 1993, 1994, Cordovilla et al. 1996, Zurayk et al. 1998, Garg, 2004; Rao et al. 2002; Tejera et al. 2004). Results from this work have demonstrated that inoculation of *P. vulgaris* plants with *B. phymatum* GR01N improves the tolerance of symbiotic nitrogen fixation to salinity, compared to plants inoculated with the reference strain CIAT899R. Similarly, it has been recently reported that inoculation of *P. vulgaris* with *E. meliloti* 4H41 isolated from Tunisian soils confers higher tolerance of common bean to drought than inoculation of plants with the reference strain *R. tropici* CIAT899 (Mhadhbi et al. 2011). In general, legumes are more sensitive to salinity than

their microsymbiont and, consequently, the symbiosis is more sensitive to salt stress than free-living rhizobia. Results from this work support previous findings that suggest that the tolerance of free-living rhizobia to salinity is also important for the symbiosis (Miller-Williams et al. 2006; Dominguez-Ferreras et al. 2009a; Nogales et al. 2002). It is generally assumed that rhizobial strains from alfaproteobacteria are competitive inoculants of legumes crops under environmental constraints (Graham, 2008). Previous reports have also found that betaproteobacteria are symbionts of the economically and ecologically important genus of *Mimosa* (Elliott et al. 2009). Results from this work have demonstrated by the first time the ability of betaproteobacteria such as *B. phymatum* GR01N to contribute to the tolerance of common bean to salinity. This prompted us to investigate its competitiveness for nodulation under salt stress compared to that of the reference strain *R. tropici* CIAT899R. Competitiveness essays were carried out by using two different techniques based on antibiotic resistance and fluorescence detection. Both techniques have been reported as good tools for rhizobia detection (Spriggs and Dakora. 2009, Stuurman et al. 2000). Both experiments showed that, under optimal conditions, *B. phymatum* GR01N or *B. phymatum* GR60 expressing GFP effectively colonized the roots of common bean in the presence of *R. tropici* CIAT899R or *R. tropici* CIAT61 expressing DsRed. Under salt stress, the ability of *B. phymatum* GR01N or GR60 strains for nodule occupancy was higher than that of the reference strains CIAT899R or CIAT61.

In summary, our results suggest that *B. phymatum* strain GR01N displays a remarkable osmotolerance under free-living and symbiotic conditions, lead us to propose this strain as a good inoculant to improve crop yield of common bean in saline soils.

Acknowledgments

This work was supported by Fondo Europeo de Desarrollo Regional-cofinanced grant CVI-3177 from Junta de Andalucía (Spain) and grant AGL2010-18607 from Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). Grant 107PICO312 from Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo and support from Junta de Andalucía to Group BIO-275 is also acknowledged. We thank personnel at services of EEZ for technical assistance with confocal microscopy analyses.

4.3. TRABAJO III

Enhanced expression of *Rhizobium etli cbb₃* oxidase has a role in the response of common bean nodules to drought

Talbi C¹, Sánchez C¹, Hidalgo-Garcia A¹, González EM², Arrese-Igor C²., Girard L³,
Bedmar EJ¹ and Delgado MJ¹

¹Estación Experimental del Zaidin, CSIC, P. O. Box 419, 18080-Granada, Spain.

²Departamento de Ciencias de Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Camopus Arrosadía, 31006 Pamplona, Spain.

³Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Cuernavaca, México.

4.3.1. Abstract

To investigate the involvement of *Rhizobium etli cbb₃* oxidase in the response of *Phaseolus vulgaris* to drought, common bean plants were inoculated with the *R. etli* strain CFNX713 which overexpresses this oxidase in bacteroids (*cbb₃⁺*) and were subjected to drought. The negative effect of drought on plant and nodule dry weight, nitrogen content, and nitrogenase activity of the nodules was more significant in plants inoculated with the wild type strain than in those inoculated with the *cbb₃⁺* strain. Regardless of the plant treatment, bacteroids produced by the strain CFNX713 showed higher respiratory capacity than those produced by the parental strain. Inoculation of plants with the *cbb₃⁺* strain alleviated the negative effect of a moderate drought on the respiratory capacity of bacteroids and the energy charge of the nodules. Expression of the FixP and FixO components of the *cbb₃* oxidase was higher in bacteroids of strain CFNX713 than in those of the wild type strain in all experimental conditions. The decline of sucrose synthase activity and the decrease of dicarboxylic acids provoked by a moderate drought was more significant in nodules from plants inoculated with the parental strain than in those inoculated with the *cbb₃⁺* strain. Taken together these results suggest that inoculation of plants with a *R. etli* strain with enhanced expression of the *cbb₃* oxidase in the bacteroids, increases the tolerance of the *Phaseolus vulgaris*-*R. etli* symbiosis to drought and can modulate carbon metabolism in the nodules.

4.3.2. Introduction

Grain legumes as common bean are important crops in agriculture, accounting for 27% of the world's primary crop production (Graham and Vance, 2003). One of their main characteristics is the ability to establish symbiotic associations with N₂-fixing soil bacteria. Legume cultivation is in continuous regression due to environmental fluctuations such as soil salinity (Delgado et al. 1993; Zahran, 1999), cold (Nayyar et al. 2005), low temperature (Prasad et al. 1994), heavy metals (Sandalio et al. 2001) or drought stress (Arrese-Igor, 2011). Drought is the major environmental factor limiting crop production and has particularly a negative impact on symbiotic nitrogen fixation (SNF) (Zahran 1999, Serraj, 2003; Arrese-Igor, 2011). The negative effect of drought on SNF is the sum of three different responses: (i) effects on the infection of legumes by rhizobia, (ii) effects on nodule growth and development and, finally, (iii) direct effects on nodule functioning. The effects of drought stress on nodule functioning usually have been perceived as a consequence of straightforward physiological responses acting on

nitrogenase activity and involving these factors: (i) some direct effect on nodule oxygen permeability, (ii) less water for the transport of N-products away from the nodule or feedback regulation by nitrogen accumulation, and (iii) the alteration of nodule carbon metabolism (González et al. 1998; Serraj et al. 2003, Arrese-Igor et al. 2011). The responses of nodule functioning to most environmental constraints can be related to the closure of the oxygen diffusion barrier (ODB), present in the cortex of nodules, provoking a decrease in oxygen availability for bacteroidal respiration and consequently a lack of energy to support the highly demanding SNF (Minchin et al. 2008).

SNF also depends on the supply of sucrose delivered from the leaves to the sink tissues like the nodules. Since SNF declines before any significant change in photosynthesis under drought seemed to dismiss any relevant role of plant carbohydrate metabolism in drought stressed nodules (Vance, 2008). Sucrose can be hydrolysed by either sucrose synthase (SS) and alkaline invertase. While alkaline invertase in nodules has a predominant role in providing hexoses from sucrose, SS produces UDP-Glucose for the formation of other nucleotide sugars and polysaccharides, such as starch and cellulose (Morell and Copeland, 1984, 1985). Studies with pea mutants showed that SS is essential for nodule functioning (Gordon et al. 1999). Using an antisense approach to knock down the nodule-enhanced SS, a similar conclusion was recently reached for the model legume *M. truncatula* (Baier et al. 2007). SS has been reported to be relevant under environmental constraints since SS has been shown to be the first nodule enzyme activity that declines under drought in both tropical legumes, such as soybean (González et al. 1995) and temperate legumes, such as pea (González et al. 1998), leading to a reduced availability of organic acids to bacteroids (Gálvez et al. 2005). This fact has been confirmed recently in a proteomic approach in *M. truncatula* (Larrainzar et al. 2007) and it has been shown that soybean cultivars with contrasting responses to drought also differ in their SS activity (Ladrera et al. 2007).

In the nodule, maintenance of nitrogenase activity is subject to a delicate equilibrium. A high rate of oxygen respiration is necessary to supply the energy demands of the nitrogen reduction process, but oxygen also irreversibly inactivates the nitrogenase complex. These conflicting demands are met by control of oxygen flux through the ODB which greatly limits permeability to oxygen (Minchin et al. 2008). Then, oxygen is delivered to the bacteroids by the plant oxygen carrier, leghaemoglobin present exclusively in the nodule (Downie, 2005). To cope with the low ambient oxygen concentration of the nodule (10 to 50 nM O₂), nitrogen-fixing bacteroids induce a high-

affinity cytochrome *cbb*₃-type oxidase. Genes encoding the *cbb*₃ oxidase complex were isolated initially from rhizobial species and named *fixNOQP* for their role in symbiotic N₂ fixation (Preisig et al. 1993; Mandon et al. 1994). *Rhizobium etli* CFN42, the microsymbiont of common bean, possesses two copies of the *fixNOQP* operon (*fixNOQPd*, *fixNOQPf*), but only *fixNOQPd* is required for optimal symbiotic nitrogen fixation (Girard et al 2000). Microaerobic induction of the *R. etli fixNOQPd* operon is controlled by at least three transcriptional regulators, FixKf, FnrNd, and FnrNchr, belonging to the Crp/Fnr family (Clark et al. 2001; Girard et al. 2000; López et al. 2001). Recently, it has been described in *R. etli* CFN42 two novel Fnr/Crp-type regulators (StoRd and StoRf, symbiotic terminal oxidase regulators). A mutation in *stoRd* (strain CFNX713) increased the synthesis of the *cbb*₃-oxidase and the nitrogen fixation capacity of *R. etli* CFN42 (Granados-Baeza, 2007). In this respect, a possible strategy to improve the tolerance of *R. etli-Phaseolus vulgaris* symbiosis to drought could be the inoculation of plants with the *stoRd* mutant strain CFNX713. The aim of this study is to evaluate the ability of the strain CFNX713, exhibiting overexpression of the *cbb*₃-oxidase, to improve the drought tolerance of symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* plants.

4.3.3. MATERIALS AND METHODS

Biological material, growth condition, and drought treatment

Seeds of common bean (*Phaseolus vulgaris*, var. Negro jamapa) were surface sterilized in 96%(v/v) ethanol for 30s, followed by 5% sodium hypochlorite for 5 min and then thoroughly washed five times with sterilized water (Delgado et al. 1994). Sterilized seeds were incubated two hours in sterile distilled water in obscurity. The imbibed seeds were deposited on plates containing 1% water-agar, and the in let them to germinate at 30°C during 60 h. Three day after sowing, selected uniform seedlings, were planted in sterile 2-kg pots (4/pot) containing a mixture of vermiculate/sand (1:1 v/v) as substrate. Each seedling was inoculated with 1ml of the strains culture of *R. etli* CFN42 (WT) or *R. etli* CFNX713 (*cbb*₃⁺) containing 10⁸ cells/ml at the log-phase of growth. Plants were grown in controlled environmental chambers (night/day temperature 19/25° C, photoperiod and 16/8h, PAR 400 μmol PAR.m⁻² s⁻¹ and relative humidity 60 to 70%) (Peralta et al. 2004). Plants were watered with N-free mineral solution (Rigaud and Puppo, 1975) and water alternately. When plants were three weeks old, they were

randomly separated into two sets: control and drought stress. Drought stress was imposed by withholding water for 5 to 7 days until plants reached a leaf Ψ_w (mean \pm SE) of about -1.5 ± 0.25 MPa (moderate drought) and for 10 to 12 days reaching values of about -2.5 ± 0.3 MPa (severe drought). Control plants were supplied daily with nutrients solution to field capacity having a leaf Ψ_w of -1.0 ± 0.4 MPa. Each water stress treatment had its own control, since they required different time periods in order to achieve a given plant water potential. Leaf water potential (Ψ_w) was measured in the first fully expanded leaf of common bean plants with C52 sample chambers connected to a HR-33T psicrómetro (Wescor. Inc., Logan UT, USA).

Nitrogen content and nitrogen-fixation assays.

Plant and nodule dry weight were determined after drying fresh plant material in plants and nodules that were heated at 60 °C for 48 h until unvariable weight. Total plant N was determined by the Kjeldahl method as described by Brouat and Crouzet (1965).

Nitrogenase activity was analyzed by using the acetylene reduction activity (ARA) assay. A Hewlett-Packard model 5890 gas chromatograph (Agilent Technologies, S.L., Madrid) equipped with a flame ionization detector was operated with a molecular sieve 5A (60 to 80 mesh) column (180 \times 0.32 cm) (Agilent Technologies, S.L.). N₂ at 60 ml min⁻¹ served as a carrier gas. Oven, injector, and detector temperatures were 60, 90, and 110°C, respectively. Nodules (0.3 g) were placed in 17-ml tubes that were filled with 10% acetylene. Gas samples (0.5ml) were taken from the tubes for ethylene analyses after incubation for 10 and 20 min. Concentration of ethylene in each sample was calculated from standards of pure ethylene. This assay has been shown to be prone to give inaccurate NF measurement under some circumstances and, therefore, absolute values may not be reliable (Minchin et al. 1983). However, the results obtained in the present manuscript are consistent with plant biomass and nitrogen content parameters.

Leghemoglobin content

Leghemoglobin content was measured by fluorimetry as previously described by La Rue and Child (1978). Nodules (0.3 g) were grounded with 4 ml Lb extraction buffer (Na₂HPO₄·2H₂O 40 mM (pH 7.4); NaH₂PO₄·H₂O 10 mM (pH 7.4); K₃Fe (CN)₆ 0.02%; NaHCO₃ 0.1%) supplemented with 0.1 g polyvinylpyrrolidone (PVPP). The homogenate was centrifugated at 12.000 rpm at 4°C for 20 min, to retain the

supernatant. Clear supernatant (50 μ l) and saturated oxalic acid (3 ml) were mixed in screwcapped tubes, which were sealed and autoclaved for 30 min at 120°C and, then, let to cool to room temperature. The fluorescence of the solutions was measured with a Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Japan) spectrophotofluorometer equipped with a mercury-xenon lamp and a RF-549 red-sensitive photomultiplier. The excitation wavelength was 405 nm and the emission monochromator setting was 650 nm. The difference in fluorescence between heated and unheated samples was proportional to haem protein concentration.

Bacteroid fractionation and heme c staining

Bacteroids were prepared as previously described (Mesa et al. 2004). In brief, 1.5 g of fresh nodules was ground in 7.5 ml Tris/HCl (pH 7.5) supplemented with 250 mM mannitol. The homogenate was filtered through four layers of cheesecloth and was centrifuged at 250 g at 4°C for 5 min to remove nodule debris. The resulting supernatant was centrifuged two times at 12,000 \times g at 4°C for 10 min and was washed twice in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7). Bacteroids were resuspended in 3 ml of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7) containing 100 μ M 4-amidinophenylmethanesulfonyl fluoride, RNase (20 μ g ml⁻¹), and DNase I (20 μ g ml⁻¹). Cells were disrupted using a French pressure cell (SLM Aminco, Jessup, MD, U.S.A.). The cell extract was centrifuged at 20,000 g for 20 min to remove unbroken cells, and the supernatant was then centrifuged at 140,000 g for 1 h. The membrane pellet was resuspended in 100 μ l of the same buffer. Membrane protein aliquots (30 μ g) were diluted in sample buffer (124 mM Tris-HCl [pH 7.0], 20% glycerol, 4.6% sodium dodecyl sulfate (SDS), and 50 mM 2-mercaptoethanol), incubated at room temperature for 10 min, separated at 4°C in SDS-12% polyacrylamide gel electrophoresis, transferred to a nitrocellulose filter, and stained for haem-dependent peroxidase activity by chemiluminescence (Vargas et al. 1993) using the detection kit ‘Super Signal’ (Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc, IL, USA).

Bacteroid O₂ consumption

Bacteroid respiration was measured by incubating bacteroids in the chamber of an O₂ electrode (Hansatech) as previously described by Delgado et al. (1993). The incubation medium contained 2 ml of 25 mM phosphate buffer, pH 7.5 at 28°C, and bacteroids preparation (1-2 mg protein) without addition of any exogenous substrate. The time

taken to consume the oxygen present in the system was used to calculate the rate of oxygen consumption.

Sucrose Synthase activity

Sucrose synthase (SS) activity was determined according to Wright et al. (1998). Nodules (200 mg) were homogenized in liquid nitrogen by using a mortar and pestle with 50 mM Hepes-KOH (pH 8), 0.1 mM PMSF, 1 mM DTT, 2 mM EDTA, 20 mM MnCl₂, 1 mM benzamidine, 5 mM MgCl₂, and 1 mM CaCl₂. The homogenate was centrifuged at 15,700 g for 15 min at 4 °C. Samples up to 20 µl were incubated at 37°C for 30min in a reaction mixture 1 with 50mM Hepes-KOH (pH 7.5), 1 mM MgCl₂, 400 mM sucrose, and 5 mM UDP in a total volume of 100 µl. After incubation the reaction was stopped by heating at 95 °C for 4 min. SS activity was analyzed in 1 ml reaction mixture 2 containing 100 µl from reaction mixture 1, 10 mM NAD, and 0.01 units of UDP-glucose dehydrogenase previously prepared in 200 mM glycine-KOH (pH 8.9). NADH produced from NAD reduction was monitored at 340 nm for 30min using a spectrophotometer Shimadzu UV-1603 (Shimadzu, Tokyo, Japan).

The protein concentration was estimated by using the Bio-Rad assay, with a standard curve of varying BSA concentrations.

Sucrose content

Sucrose content was measured in nodules cytosol according to González et al. (1995). Carbohydrates were extracted from frozen nodules (200 mg) with trichloroacetic acid (TCA), followed by further washing with diethyl-ether. After centrifugation at 15,700 g at 4 °C for 20 min, samples up to 5 µl were incubated in a microplate reader with a reaction mixture containing 200 µl buffer 100 mM Hepes pH 7.3, 1 mM MgCl₂, 0.75 mM NADP, 0.85 mM ATP, 0.1 units of glucose-6-P-dehydrogenase (G6PDH) and 0.1 units of hexokinase (HK). Sucrose was measured spectrophotometrically at 340 nm after addition of invertase (20 units per well) to the reaction mixture by determining the production of NADPH.

Organic acids and adenylate energy charge analyses

Organic acid and adenylates (ATP, ADP and AMP) were extracted from nodules (0.2 g) in 5% w/v trichloroacetic acid, and samples were processed as described by Gálvez et al. (2005). Malate, citrate, succinate and α -Ketoglutarate (α KG) were

quantified by ion chromatography in a DX-500 system (Dionex) by gradient separation with an IonPac AS11 column (Dionex) according to the method recommended by the supplier (2.5 mol m⁻³ NaOH/18 % methanol to 45 mol m⁻³ NaOH/18 % methanol in 13 min)..

Adenylate energy charge (AEC) calculated as $AEC = [ATP + 0.5 ADP] / [ATP + ADP + AMP]$ was evaluated by measurement of the proportion of each adenylate by high capillary electrophoresis (HPCE) in a PACE system 5500 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). The electrolytes used were 20 mM Tris and 20 mM Na₂HPO₄·7H₂O pH 7, containing 100 mM DTAB and 1 mM EDTA. The potential applied was 30 kV. We used a capillary of 50 microns in diameter and 62/69 cm in length and a UV detector at 260 nm. Quantification was performed by interpolation with standard of AMP, ADP and ATP in a concentration range of 0.005 to 0.1 mM.

Transcript levels

Total RNA was extracted from nodules harvested from the different treatments using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), treated with DNaseI Amplification Grade (Invitrogen) and reverse transcribed using SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). For each RNA sample, control experiments in which the reverse transcriptase step was omitted were done to confirm the absence of any residual DNA. The complementary DNA was amplified with the specific primers FwSSPv (5'-GCACAGTGCCTCCTGAAACC-3') and RvSSPv (5'-CTTGAGATCCACTTGCGAAC-3') for *PvSSn* and FwActinPv (5'-GTATGTTGCCATTCAGGCCGTTCTTTCTCT-3') and RvActinPv (5'-CGACCCGCAAGATCAAGACGAAGGA-3') for *PvActin* gene according to Silvente et al. (2003) and Valdes-López et al. (2008), respectively. After initial denaturation step at 95 °C for 5 min and 30 cycles of amplification (94 °C for 1 min; 55 °C for 1 min; 72 °C for 1 min) and a final elongation step at 72 °C for 5 min, PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gels.

4.3.4. RESULTS

Plant growth and symbiotic nitrogen fixation

Plant water status during the different treatments was monitored by measuring water potential (Ψ_w) of the first fully expanded leaf. The effect of either moderate or severe

drought stress on leaf Ψ_w of plants inoculated with CFNX317 (cbb_3^+) strain was similar to that of plants inoculated with the wild type (WT) CFN42 strain (data not shown).

A moderate drought provoked a decrease of about 33% in dry weight (PDW) of plants inoculated with the WT strain (Table 1). In plants inoculated with the cbb_3^+ strain and subjected to moderate drought, PDW was reduced only 23% compared to control plants. Specific nitrogen content (mg/g plant) [N] was significantly reduced by moderate drought in plants inoculated with the WT strain (Table 1) (38% versus control plants). However, this parameter was not significantly affected in plants inoculated with the cbb_3^+ strain (Table 1). After a severe drought, a 60% and 42% reduction of PDW and [N] content, respectively, was observed in plants inoculated with the WT strain, while a reduction of only 26% and 18%, respectively, was observed in those inoculated with the cbb_3^+ strain compared to control plants.

Table 1. Plant dry weight (PDW [g plant^{-1}]), and nitrogen content [N] (mg g^{-1} plant) of plants inoculated with *R.etli* CFN42 (WT), or *R.etli* CFNX317 (cbb_3^+) strains. Plants were subjected to moderate or severe water deficit conditions. Values in a column followed by the same lower-case letter are not significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ (n=9).

Strain	Treatment	Moderate drought		Severe drought	
		PDW	[N]	PDW	[N]
WT	Control	0.540 ± 0.07ab	24 ± 0.30a	0.693 ± 0.03b	24 ± 0.60b
	Stress	0.361 ± 0.02c	15 ± 0.30b	0.283 ± 0.06c	14 ± 0.07c
cbb_3^+	Control	0.618 ± 0.05a	25 ± 0.20a	0.755 ± 0.07a	32 ± 0.70a
	Stress	0.473 ± 0.07b	21 ± 0.30a	0.559 ± 0.04b	27 ± 0.10b

The effect of inoculation with the WT or cbb_3^+ strains in the nodule number (NN) and nodule dry weight (NDW) of plants subjected to water deficit was also assessed (Table 2). Regardless of the plant treatment, no significant differences of NN were observed between plants inoculated with either the WT or the cbb_3^+ strain (Table 2). Conversely,

NDW per plant was negatively affected by a moderate water deficit with values being more drastically reduced in plants inoculated with the WT strain (44%) than those of plants inoculated with the *cbb₃⁺* strain (23%) compared to control plants. A higher decrease of NDW was observed in plants subjected to a severe stress and inoculated with the WT (73%) or the *cbb₃⁺* (68%) strain compared to control plants (Table 2).

The ratio between NDW and NN per plant as estimation of the individual nodule dry weight from control plants inoculated with the *cbb₃⁺* strain was significantly higher (7.3 mg per nodule) than that of nodules from plants inoculated with the WT strain (3.6 mg per nodule). A moderate drought decreased around 43% and 22% nodule growth in plants inoculated with the WT and the *cbb₃⁺* strains, respectively, compared to control plants. Similarly a severe stress provoked a decrease of 73% and 66% of individual nodule weight in plants inoculated with the WT and the *cbb₃⁺* strains, respectively, compared to control nodules. These results indicate that inoculation of plants with the *cbb₃⁺* strain produced a positive effect on nodule growth compared to plants inoculated with the WT strain either in plants subjected to normal irrigation or to drought conditions.

Table 2. Nodules number (NN) and nodule dry weight (NDW (g plant⁻¹) of plants inoculated with the *R. etli* CFN42 (WT), and CFNX317 (*cbb₃⁺*) strains. Nodules were isolated from plants subjected or not (control) to moderate or severe drought conditions. Values in a column followed by the same lower-case letter are not significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ (n=9).

Strain	Treatment	Moderate drought		Severe drought	
		NN	NDW	NN	NDW
WT	Control	47 ± 04a	0.252 ± .04b	44 ± 10a	0.275 ± 0.04b
	Stress	40 ± 09a	0.142 ± 0.03c	42 ± 09a	0.075 ± 0.02c
<i>cbb₃⁺</i>	Control	48 ± 04a	0.351 ± 0.03a	47 ± 11a	0.378 ± 0.05a
	Stress	47 ± 04a	0.270 ± 0.02b	48 ± 10a	0.120 ± 0.03c

Specific nitrogenase activity expressed as acetylene reduction activity (ARA) on a nodule dry weight basis and leghaemoglobin (Lb) content of the nodules as an estimation of nodule functionality were also measured (Table 3). Independently of the plant treatment, inoculation of plants with the *cbb₃⁺* strain enhanced ARA or Lb content compared to those plants inoculated with the WT strain. Similarly, Granados-Baeza and colleagues (2007) reported that inoculation of common bean plants with the strain CFNX713 of *R. etli* enhanced nitrogen-fixing capacity of the nodules. Plants inoculated with the WT strain and subjected to moderate drought showed an inhibition of ARA of about 43% compared to control plants. This activity was drastically dropped under severe drought (51% compared to control plants) (Table 3). However, in plants inoculated with the *cbb₃⁺* strain, the decrease of ARA did not exceeded 16% when plants were subjected to moderate drought reaching a 38% reduction under severe drought compared to control plants (Table 3).

Moderate drought provoked a significant decline in Lb content of about 14% in plants inoculated with the WT strain compared to control plants (Table 3). By contrast, this

parameter was not affected in plants inoculated with the *cbb₃⁺* strain and subjected to a moderate drought. When plants were subjected to severe drought, a negative effect on Lb content was observed being more significant in plants inoculated with the WT than in those inoculated with the *cbb₃⁺* (48% versus 38%, respectively) (Table 3).

Table 3. Acetylene reduction activity (ARA [nmol C₂H₂ h⁻¹ g⁻¹ FWN]) and leghaemoglobin (Lb [mg Lb g⁻¹ FWN]) content in nodules. Plants were inoculated with the *R. etli* CFN42 (WT), or *R. etli* CFNX317 (*cbb₃⁺*) strains. Nodules were isolated from control plants or plants subjected to water deficit conditions. Values in a column followed by the same lower-case letter are not significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ (n=9).

Strain	Treatment	Moderate drought		Severe drought	
		ARA	Lb	ARA	Lb
WT	Control	234 ± 10a	5.7 ± 0.50c	223 ± 06a	6.9 ± 0.30b
	Stress	134 ± 7.5c	4.9 ± 0.40b	112 ± 13c	3.6 ± 0.10d
<i>cbb₃⁺</i>	Control	277 ± 17b	6.7 ± 0.35a	263 ± 12b	8.6 ± 0.30a
	Stress	234 ± 14a	6.0 ± 0.20a	161 ± 15d	5.3 ± 0.30c

Bacteroids respiratory capacity

Bacteroids of *cbb₃⁺* strain expressed a major respiratory capacity than WT bacteroids after their isolation from nodules of plants grown either under control or stress conditions (Fig. 1a). A moderate drought decreased respiratory capacity of WT bacteroids about 39% compared to respiration levels observed in bacteroids isolated from control plants. By contrast, respiratory capacity of *cbb₃⁺* bacteroids from plants subjected to moderate drought increased about 13% compared to that observed in bacteroids from control plants (Fig. 1a). A severe drought reduced about 40% and 20%, respiratory capacity of WT and *cbb₃⁺* bacteroids, respectively (Fig. 1a).

After haem *c* staining analyses of proteins from bacteroid membranes, two bands of 32 and 27 kDa were detected (Fig. 1b). These proteins were previously identified as the

FixP and FixO components of the *cbb₃* terminal oxidase of *R. etli* (Granados-Baeza et al. 2007). As previously reported by Granados-Baeza and colleagues (2007), bacteroids of the *cbb₃⁺* strain showed increased expression of FixP and FixO of about 60 % than those of the WT strains after their isolation from control plants (Fig. 1b). Similarly, under moderate drought conditions, expression of FixP and FixO proteins was about 20% higher in *cbb₃⁺* bacteroids than in WT bacteroids (Fig. 1b). Interestingly, both WT and *cbb₃⁺* bacteroids responded to a moderate drought by increasing the expression of FixP and FixO (Fig. 1b).

Under moderate drought, the adenylate energy charge (AEC) in WT nodules was found to be significantly lower (0.38 ± 0.03) than in WT nodules from control plants (0.54 ± 0.06) (Fig. 1c). By contrast, the AEC was not affected by a moderate drought in nodules formed by the *cbb₃⁺* strain and remained at 0.60 ± 0.01 . A significant decrease of AEC was observed in nodules from plants subjected to a severe drought stress and inoculated with any of the strains (Fig. 1c).

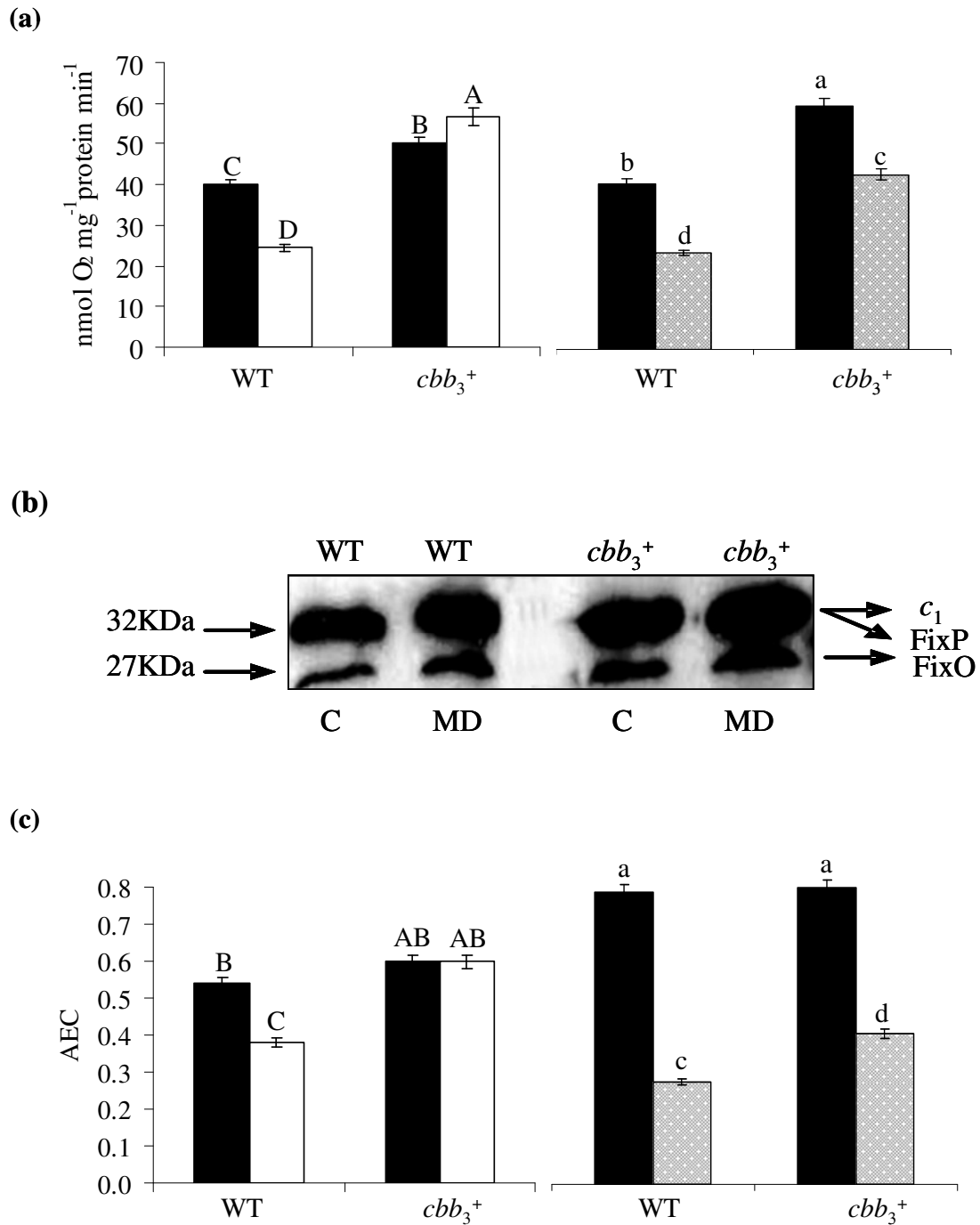


Figure 1. (a) Oxygen consumption by bacteroids (b) FixP and FixO expression in membranes of bacteroids and (c) adenylate charge energy of nodules (AEC) from *P. vulgaris* plants inoculated with *R. etli* CFN42 (WT) and CFNX317 (*cbb*₃⁺) strains. Plants were grown under normal irrigation (C, ■) or were subjected to moderate (MD, □) or to severe drought (▨). For each treatment bars with different letters are significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ (n=6).

Sucrose synthase activity, gene expression and carbon metabolites

In this work, we have investigated the role of *cbb₃* overexpression in the response of SS activity and expression of common bean nodules to drought. As shown in Figure 2a, inoculation of plants with the *cbb₃⁺* strain resulted in an increased of SS activity in the nodules compared to those from plants inoculated with the WT strain either under control or moderate drought conditions. A moderate drought caused a significant decline in SS activity of the nodules which was more significant in those produced by the WT strain (49%) than in those produced by the *cbb₃⁺* strain (only 15%) compared to control plants (Fig. 2a). A severe drought provoked a dramatic decline in SS activity in nodules produced by the WT and *cbb₃⁺* strains (71% and 67%, respectively, compared to control plants) (Fig. 2a). The decline in SS activity observed in nodules subjected to a moderate drought was correlated with the accumulation of sucrose in WT nodules which was higher than that observed in *cbb₃⁺* nodules than in *cbb₃⁺* nodules (37% versus 15%, respectively, compared to control plants) (Fig. 2b).

In this work, expression of *PvSSn* in nodules produced by the WT and *cbb₃⁺* strains and obtained from plants subjected or not to drought has been investigated. Nodules produced by the *cbb₃⁺* strain showed increased expression of *PvSSn* gene of about 53% than those produced by the WT strain after their isolation from control plants. Similarly, in plants subjected to a moderate drought expression of *PvSSn* in *cbb₃⁺* nodules was about 60% higher than that observed in WT nodules (Fig. 2c). In both, WT and *cbb₃* nodules, a moderate drought stress provoked a slight decrease of *PvSSn* gene expression (Fig. 2c).

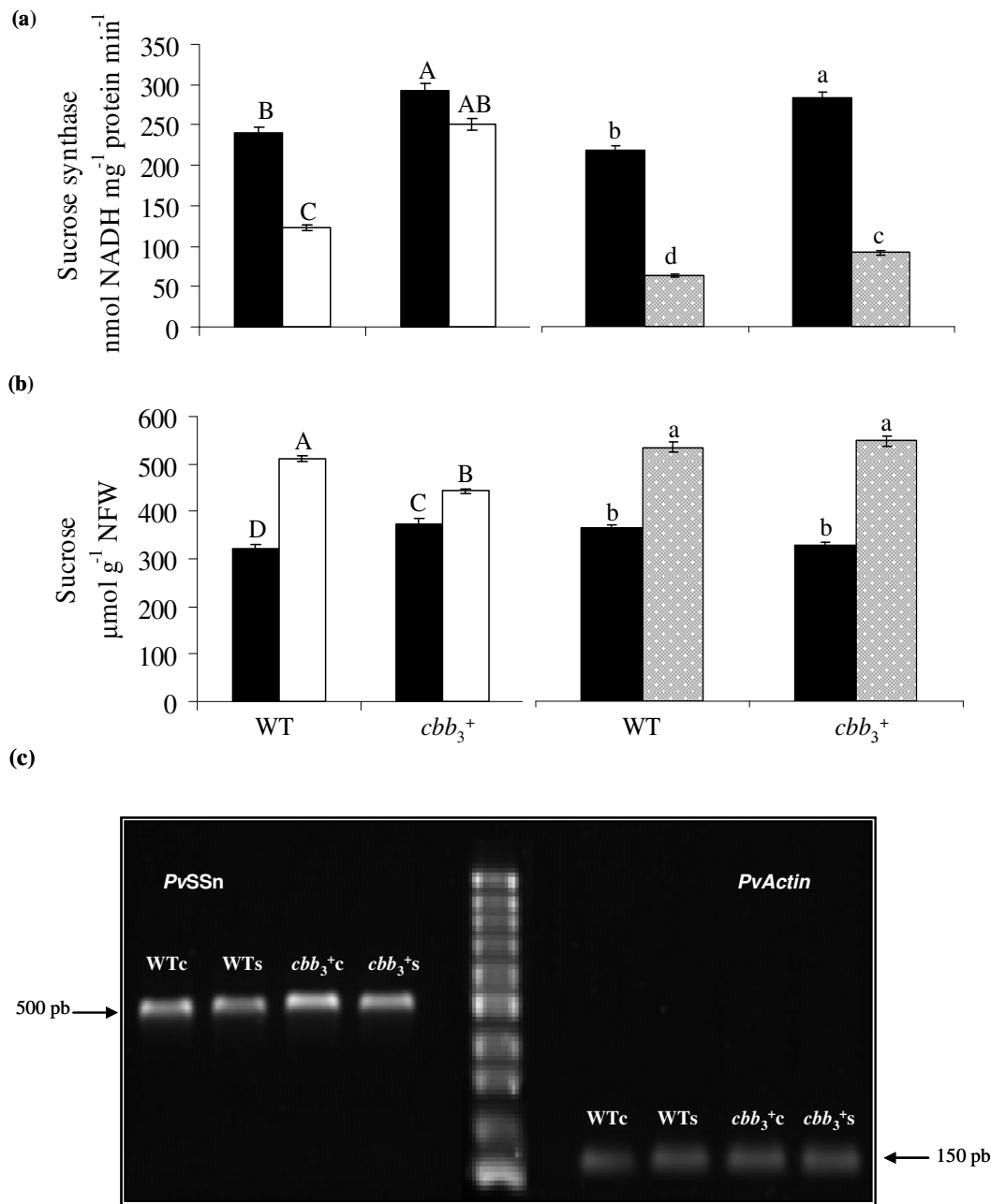


Figure 2. (a) Sucrose synthase activity (b) Sucrose content and (c) Reverse transcription-PCR detection of *PvSSn* transcripts in nodules of *P. vulgaris* inoculated with WT or *cbb₃⁺* strains and grown under normal (c) or moderate drought (s) conditions. *Actin* gene was used as internal standard. Data are representative of reactions performed with two independent RNA samples. In a) and b), plants were grown under normal irrigation (■) or were subjected to moderate (□) or to severe drought (▨). For each treatment bars with different letters are significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$ (n= 4).

The application of a moderate drought produced a decline in malate content in nodules being more significant in WT nodules (41%) than that observed in nodules produced by the *cbb₃⁺* strain (20%) compared to control nodules (Fig. 3a). A moderate drought provoked also a decline in the nodules content of other dicarboxylic acid as α -KG, succinate and citrate being more significant in nodules produced by the WT strain than in those produced by the *cbb₃⁺* strain compared with values observed in control nodules (Fig. 3 b,c and d, respectively). A severe drought had a dramatic negative effect on malate content in nodules formed by WT or *cbb₃⁺* strains (58% and 54%, respectively) compared to control plants (Fig. 3a). Upon a severe drought, a strong decline in α -KG, succinate and citrate content in WT and *cbb₃⁺* nodules was also observed (Fig. 3 b, c and d, respectively).

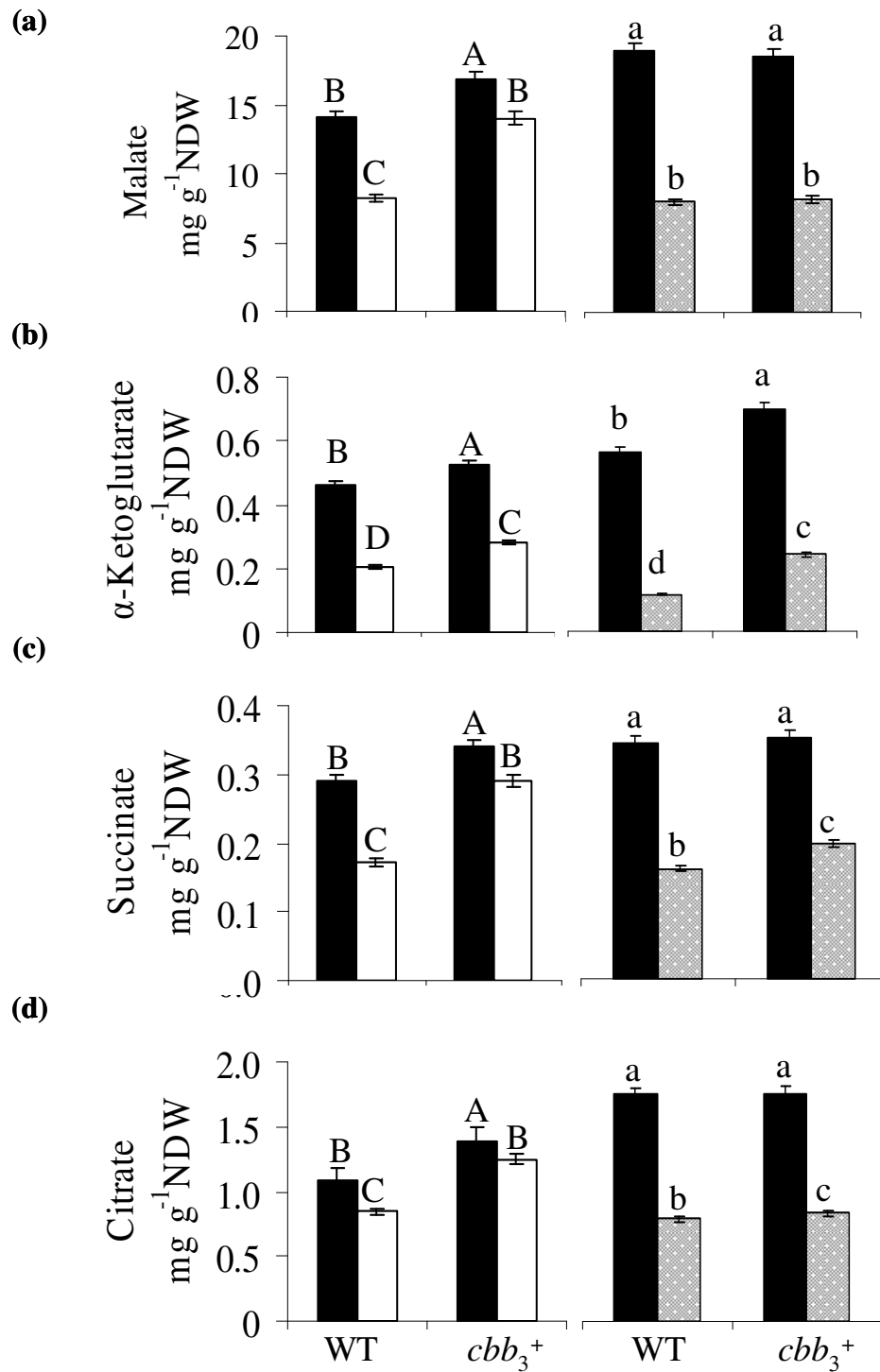


Figure 3. (a) malate; (b) succinate; (c) α-Ketoglutarate and (d) citrate content from root nodules of *P. vulgaris* inoculated with WT or *cbb*₃⁺ strains. Plants were grown under normal irrigation (■) or were subjected to moderate (□) or to severe drought (▒). For each treatment bars with different letters are significantly different as determined by the Tukey HSD test at $P \leq 0.05$.

4.3.5. Discussion

Oxygen is critical for symbiotic nitrogen fixation (SNF) since it is a highly energy-consuming process that occurs under extremely low O₂ concentrations due to the sensitivity of nitrogenase complex to this molecule. Therefore, symbiosis requires a respiratory chain with high affinity for oxygen, closely coupled to ATP production. This requirement is fulfilled in bacteroids by a special three-subunit terminal oxidase, the cytochrome *cbb₃* oxidase encoded by the *fixNOQP* operon (Preisig et al. 1993). *Rhizobium etli* CFN42 has two copies of *fixNOQP* genes, but only the copy located on the symbiotic plasmid (*fixNOQPd*) is required for the establishment of an effective symbiosis (Girard et al. 2000). In previous studies, isolation of *R. etli* mutants with derepressed expression of cytochrome terminal oxidases fixed more nitrogen fixation during symbiosis than did the wild type (Miranda et al. 1996, Silvente et al. 2002). More recently, it has been reported that inactivation of the *R. etli* Crp/Fnr-type transcriptional regulator StoRd (strain CFNX713) increases *cbb₃* expression and showed an enhanced nitrogen fixation capacity (Granados-Baeza et al. 2007). One of the nodule responses to environmental constraints and, in particular, to drought, is the closure of the ODB and the decrease in oxygen flux in nodules resulting in the limitation of oxygen availability for bacteroidal respiration. In this context, inhibition of respiratory capacity of bacteroids has been observed in soybean plants subjected to drought compared with unstressed plants (Diaz del Castillo and Layzell 1995). Similarly, the inhibitory effect of NaCl on SNF by pea nodules has been associated to the decrease in bacteroid respiration (Delgado et al. 1993, 1994). According to these observations, results from this work have demonstrated an inhibitory effect of drought on respiratory capacity of bacteroids from common bean nodules produced by *R. etli* CFN42.

In *M. truncatula*-*S. meliloti* (Aydi et al. 2004) and *Cicer arietinum*-*Mesorhizobium ciceri* (L'taief et al. 2007) it has been reported that tolerance of plants to salinity is associated with a higher nodule conductance and oxygen uptake capacity. Thus, inoculation with rhizobia strains with increased respiratory capacity looks a promising strategy to improve symbiotic nitrogen fixation tolerance to drought. In this work, it has been demonstrated for the first time that inoculation of plants with the strain CFNX713 of *R. etli* that overexpresses the *cbb₃* oxidase alleviated the negative effect of drought on the respiratory capacity of the bacteroids and increased the tolerance of symbiotic nitrogen fixation to drought. In this work we propose that one approach to enhance the plant response to drought is the overexpression of the rhizobia *cbb₃* oxidase.

By contrary to the drought effect on the respiratory capacity of bacteroids, an increase in the expression of the FixP and FixO components of the *cbb₃* oxidase was observed as an early response to drought. Since *R. etli fixNOQPd* genes are induced by low oxygen conditions (Girard et al. 2000), it might be possible that a decrease in oxygen diffusion to the nodules provoked by drought increased expression of these genes. In spite of the induction of *cbb₃* expression as an early response to drought, respiratory capacity of bacteroids isolated from stressed nodules and incubated under non-limited oxygen conditions was inhibited. This observation suggests that in addition to oxygen other metabolic constrains such as carbon availability for respiration must be involved in the negative effect of drought on bacteroidal respiratory capacity.

Confirming previous results, in this work, inhibition of SS and accumulation of sucrose was observed in common bean nodules in response to drought. Inoculation with the strain *cbb₃⁺* alleviated the negative effect of drought on carbon metabolism.

Environmental constraints may regulate SS functioning by downregulating SS gene expression leading to a decline of SS activity (Gálvez et al. 2005; Gonzalez et al. 1995, 1998; Gordon et al. 1997). In *Phaseolus vulgaris*, two SS genes have been identified (Silvente et al. 2003). One of these genes is expressed almost exclusively in nodules (*PvSSn*) and the other is expressed in all the tissues tested (*PvSS*). It has been shown that expression of the *PvSSn* gene is dependent on C availability and mediated by the status of nitrogen metabolism components in bean nodules (Silvente et al. 2003). In this work, we have demonstrated that inoculation of common bean with the strain CFNX713 overexpressing *cbb₃* oxidase induces the expression of *PvSSn* gene in nodules. Supporting our results, it has been previously reported that inoculation of *Phaseolus vulgaris* plants with a *R. etli* mutant (CFN037) having increased respiratory capacity produced an induction of SS activity (Silvente et al. 2002). By contrary to our findings, in those studies the differences in SS activity were not correlated with the SS transcript levels. However, Silvente and colleagues (2002) were not able to establish the extent to which the *PvSSn* gene is expressed in nodules since in their work the SS probes used in the Northern analyses did not distinguish between *PvSSn* or *PvSS* genes.

Sucrose is cleaved in mature nodules to produce UDP-Glucose and fructose which, after phosphorylation by hexokinases, enter the glycolytic or oxidative pentose phosphate pathways (OPPP) and are metabolized to phosphoenolpyruvate (PEP) which is converted to malate via the combined action of PEP carboxylase (PEPC) and malate dehydrogenase. It has been suggested that the strong decline in SS activity following

drought in soybean nodules produced a subsequent potential decrease in the glycolytic flux (Gonzalez et al. 1995; 1998). In pea plants, it has also been shown that the levels of hexoses as well as malate decreased in water stressed nodules compared to unstressed nodules (Galvez et al. 2005). Similarly, in our work it has been shown a dramatic decline in nodule malate content in drought stressed nodules. It might be possible that malate deprivation under drought could be due to the inhibition of sucrose synthase activity or to the impairment HCO_3^- binding to PEP to form oxalacetate, and subsequently, malate. However, analyses of PEPC activity indicated that this enzyme activity was not affected by drought in our experiments (data not shown). Although it has been proposed that both PEPC (Schulze 2004; Nomura et al. 2006) and carbonic anhydrase activities (Coba de la Peña et al. 1997; Galvez et al. 2000) are essential for nodule performance, it is still to be shown if they play any significant role in SNF regulation under drought.

Taken together our results suggest that is the oxygen availability to the nodules to support bacteroid respiration and to provide energy to support the highly demanding SNF the main process involved in the response of common bean nodules to drought. In fact when these plants are inoculated with a strain overexpressing the *cbb₃* oxidase which increase respiratory capacity in the nodules the negative effect of drought on SS activity and malate content in the nodules is significantly less dramatic compare to that from WT nodules.

Results from this study suggest that a major efficiency in the consumption of oxygen by the bacteroids could be a signal that modulates the expression of key enzymes of carbon metabolism such as SS in response to drought stress.

4.3.6. Acknowledgments

This work was supported by Fondo Europeo de Desarrollo Regional-cofinanced grants [grant number CVI-3177] from Junta de Andalucía (Spain) and [grant number AGL2010-18607 and AGL2008-00069] from Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) and by Ciencia y Tecnología para el Desarrollo [grant number 107PICO312]. Support from the Junta de Andalucía to Group BIO-275 is also acknowledged. Authors thank Gustavo Garijo for technical assistance.

5. DISCUSIÓN GENERAL

5.1. *Burkholderia phymatum*, aislada de suelos de Marruecos, forma nódulos efectivos en *Phaseolus vulgaris*

La identificación de especies de rizobia capaces de establecer simbiosis fijadoras de nitrógeno más eficientes con sus correspondientes leguminosas es un procedimiento habitual de investigación en la búsqueda de pares planta-bacteria más productivos en su ambiente natural. Mediante experimentos de planta trampa utilizando suelo salino de la región de Oujda (Marruecos) se inició, mediante este trabajo, en 2005 la búsqueda de nuevas especies bacterianas capaces de fijar nitrógeno con *P. vulgaris*, una leguminosa de interés tanto en la economía como en la alimentación humana y animal de la población de la región oriental de Marruecos.

A partir de los extractos de nódulos aislados de *Phaseolus* se obtuvieron 52 cepas que representaron las diferentes morfologías de las unidades formadoras de colonias que aparecieron en las placas de cultivo. Puesto que las bacterias que presentan el mismo perfil REP-PCR pertenecen a la misma especie (de Bruijn, 1992; Versalovic et al. 1998; Ishii y Sadowsky, 2009), el empleo de esta técnica de huella genética como herramienta molecular permitió agrupar las cepas bacterianas que se aislaron de los nódulos en dos grandes grupos REP, si bien el grupo I incluía 5 subgrupos (ver Figura 1S, Anexo). La secuencia casi completa del gen 16S rRNA de una cepa representativa de cada grupo y subgrupo REP indicó que 46 de los 52 aislados pertenecían al orden Rhizobiales de las *Alphaproteobacteria*. De las 6 cepas restantes, 2 no se han identificado todavía, y las 4 restantes (GR01, GR03 GR05 y GR06) se clasificaron como miembros de la familia *Burkholderiaceae* de las *Betaproteobacteria*. La secuencia del gen 16S rRNA de cada una de las 4 cepas es casi idéntica y todas ellas están filogenéticamente relacionadas (99% de identidad) con la de *B. phymatum* STM815^T, una cepa que se aisló originalmente de *Machaerium lunatum* (Moulin et al. 2001; Vandamme et al. 2002). Aún más, un análisis filogenético detallado que incluyó los aislados de *Phaseolus* y 30 especies tipo de *Burkholderia* demostró que las cepas GR se agrupan claramente con *B. phymatum* STM815^T (Figura. 1, trabajo 1). Posterior confirmación que las cepas GR01, GR03 GR05 y GR06 de *Phaseolus* podían considerarse como *B. phymatum* se obtuvo al comprobar que la secuencia de nucleótido del gen simbiótico *nodC* de cada una de ellas fue 99% idéntica a la de *B. phymatum* STM815^T, y que las cepas poseían secuencias idénticas. En este sentido, no es de extrañar que las cepas de *Burkholderia* aisladas de *Phaseolus* fueron capaces de nodular *M. pigra*, *Acacia cochliacantha*, *A. bilimeki*, *Leucaena glauca* y *Prosopis chilensis*, leguminosas en donde previamente se había

descrito la capacidad de *B. phymatum* STM815^T para formar nódulos. Por otra parte, los aislados GR01, GR03 GR05 y GR06 son auténticos endosimbiontes de *Phaseolus* ya que después de su aislamiento fueron capaces de formar nódulos efectivos en su planta hospedadora. No obstante, la cepa GR01 fue incapaz de infectar otras leguminosas granos tal como es el caso de *Pisum*, *Cicer*, *Glycine*, *Vicia*, *Medicago* y *Trifolium*.

La amplificación y secuenciación del gen *nifH* de las cepas aisladas de *Phaseolus* reveló que todas ellas poseían una secuencia similar, que fue 99% idéntica a la de *B. phymatum* STM518^T. Al igual que *B. phymatum* STM518^T, la cepa GR01 fijó N₂ *ex planta* (determinado como la reducción de acetileno a etileno) cuando se cultivo en medio semisólido JMV. De ahí, que la presencia del gen simbiótico *nifH* no sea sorprendente. La capacidad fijadora de nitrógeno es común entre las especies de *Burkholderia*, y se ha demostrado tanto mediante la detección de la producción de etileno a partir de acetileno y la presencia de los genes *nifH* (Caballero-Mellado et al. 2007; Estrada-de los santos et al. 2001; Gillis et al. 1995; Goris et al. 2004; Perin et al. 2006; Reis et al. 2004), como mediante ensayos de diluciones de N₂ isotópico (Martínez-Aguilar et al. 2008). No obstante, los valores de actividad nitrogenasa fueron la mitad de los detectados en *B. phymatum* STM815^T cultivada en condiciones similares (Elliott et al. 2007).

B. phymatum STM815^T también formó nódulos en *P. vulgaris*. Sin embargo, su eficacia simbiótica, evaluada como peso seco de la parte aérea de la planta, fue la mitad de la obtenida cuando las plantas se inocularon con la cepa GR01. La eficacia simbiótica de los aislados de *P. vulgaris* en *Mimosa* no se ha perseguido en este estudio.

Nuestros resultados sugieren que las cepas de *Burkholderia* aisladas de *Mimosa* y de *Phaseolus* han adquirido sus genes simbióticos bien de un ancestro común o mediante transferencia horizontal entre ellos, desconociéndose la dirección de la transferencia.

Aunque limitada a las cepas NGR114 y NGR195A aisladas de *M. invisa* y *M. pudica* en Papua Nueva Guinea, respectivamente (Elliott et al. 2007), a la cepa STM815^T, obtenida de nódulos de *M. lunatum* en la Guayana Francesa (Moulin et al. 2001; Vandamme et al. 2002), y a las cepas GR01, GR03 GR05 y GR06 de *P. vulgaris* en Marruecos, nuestros resultados plantean preguntas acerca de la biogeografía de *B. phymatum*. Después de su aislamiento, esta especie se ha encontrado asociada a leguminosas del género *Mimosa* crecidas en los ambientes tropicales y neotropicales. Por lo tanto, el hecho de encontrarla en ambientes desérticos del extremo oriental de Marruecos extiende, por una parte, su rango de hospedador y, por otra, hábitat

biogeográfico de este grupo de microsimbiontes. En este sentido, sería necesario explorar la presencia de *Burkholderia* en otras leguminosas y otros hábitats de manera que se pueda establecer, en futuros trabajos, la consistencia de la asociación entre *Burkholderia* y las leguminosas.

5.2. *Burkholderia phymatum* mejora la tolerancia a salinidad de la fijación simbiótica de nitrógeno en *Phaseolus vulgaris*.

El interés para mejorar la tolerancia de los cultivos a condiciones de estreses abióticos tal como la salinidad ha ido creciendo en los últimos años. La utilización de rizobios tolerantes a estrés osmótico es una prometedora estrategia para mejorar la eficiencia de la simbiosis y a su vez la producción de las leguminosas en suelos afectados por salinidad (Zahran, 1999; Mhadhbi et al. 2008, 2011; Mnasri et al. 2007; Ben Rhomdhane et al. 2007; Meuelenberg y Dakora, 2007). En este trabajo se ha analizado la capacidad de *B. phymatum* GR01N, microsimbionte de *P. vulgaris* proveniente de suelos semi-áridos del norte de Marruecos, para tolerar altos niveles de estrés osmótico tanto en vida libre como en simbiosis. *R. tropici* CIAT899R, cepa aislada de Latino América, considerada un microsimbionte efectivo de *P. vulgaris* que tolera diversos estrénes abióticos tal como la salinidad (Martínez-Romero et al. 1991; Nogales et al. 2002) se ha utilizado en este trabajo como cepa de referencia. Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado que *R. tropici* CIAT899R es más sensible a estrés osmótico que *B. phymatum* GR01N en vida libre.

Uno de los principales mecanismos de adaptación de las bacterias a las condiciones hiperosmóticas es la acumulación intracitoplasmática de solutos compatibles (da Costa et al. 1998) mediante su transporte desde el exterior o mediante síntesis *de novo*. La capacidad de *B. phymatum* GR01N para sobrevivir a concentraciones de sal y sacarosa superiores a las toleradas por la cepa *R. tropici* CIAT899R podría ser debido a la acumulación de mejores y más potentes osmoprotectores que los acumulados por la CIAT899R. Los análisis de ¹³C-NMR demostraron que, la respuesta de la cepa GR01N a NaCl resultó en la acumulación de trehalosa, manitol, y alanina. Mientras que, estudios realizados por Fernández-Aunión et al (2010), mostraron que *R. tropici* CIAT899 responde a un estrés salino acumulando sólo trehalosa y glutamato como osmoprotectores. La implicación de la trehalosa en la tolerancia al estrés osmótico se ha

demostrado en *Escherichia coli* (Strøm and Kaasen, 1993), *S. meliloti* (Dominguez-Ferreras et al. 2009b) y *B. japonicum* (Sugawara et al. 2010). En estos trabajos, se obtuvieron mutantes que carecen del gen *OtsA* implicado en la síntesis de trehalosa, las cuales fueron más osmosensibles que la cepa parental.

En las especies pertenecientes a la clase alfa-proteobacteria el glutamato es generalmente usado para compensar las elevadas concentraciones intracelulares de K^+ que se producen en los primeros estadios de la respuesta a un incremento de la salinidad externa (da Costa et al. 1998; Belitsky et al. 2001). En este trabajo, no se detectó este aa en los extractos de *B. phymatum* GR01N. En cambio manitol, y alanina se acumularon en respuesta al estrés hiperosmótico. La presencia de manitol por la cepa GR01N podría deberse a una activa acumulación desde el medio externo. El manitol es frecuentemente utilizado como osmoprotector externo, y es raramente sintetizado por las bacterias como un soluto compatible (da Costa et al. 1998). Generalmente, la síntesis de los solutos compatibles requiere un gasto considerable de energía por ello, en la mayoría de los casos la acumulación de los osmoprotectores es preferible a la síntesis endógena de los solutos compatibles (Oren, 1999).

En cepas de *Burkholderia cenocepacia* se ha propuesto a la alanina como un soluto que se acumula en respuesta a un estrés osmótico (Behrends et al. 2011). Sin embargo, estos autores observaron que cepas que acumulan trehalosa o glicina-betaina fueron más tolerantes al estrés que aquellas que acumularon aa tales como alanina, fenilalanina o glutamato. Estos resultados sugieren por tanto que la acumulación de aa estaría implicada en una respuesta general al estrés más que en conferir tolerancia a un estrés osmótico. Consideradas en conjunto estas observaciones, los resultados de este trabajo sugieren que el mayor grado de la tolerancia de la cepa GR01N a la presencia de NaCl en comparación con la de *R. tropici* CIAT899R, puede deberse a la combinación de la trehalosa y manitol, o a una mayor acumulación de trehalosa que en la cepa de referencia CIAT899R.

R. tropici CIAT899R se considera un eficiente microsimbionte de *P. vulgaris* que tolera pH ácido (Graham et al. 1994; Martínez-Romero et al. 1991; Morón et al. 2005 y Vinuesa et al. 2003). Bacterias pertenecientes al género *Burkholderia* son características de ambientes con pH neutro (Liesack et al. 1997). Sin embargo, recientes evidencias sugieren una gran abundancia de dichas bacterias en ambientes ácidos (Reís et al. 2004). La cepa *B. phymatum* GR01 se aisló tanto de la rizosfera como de los nódulos de plantas de judía cultivadas en suelos alcalinos del norte de Marruecos con un pH de 8

(Talbi et al. 2010). La tolerancia de *B. phymatum* GR01 a pH básico se ha confirmado en este trabajo y sugiere que dicha cepa puede ser un buen competidor para la infección de raíces de plantas de judía en entornos salinos/alcalinos.

En este trabajo también se ha evaluado la eficiencia de la cepa GR01N como endosimbionte de *P. vulgaris* en condiciones de salinidad considerado este un estrés que afecta dramáticamente la productividad de las leguminosas en zonas semi-áridas. El efecto negativo de la salinidad sobre la competitividad, proceso de nodulación, fijación de nitrógeno y crecimiento de las plantas ha sido ampliamente estudiado en leguminosas grano (Zahrn y Sprent, 1986; Dua, 1992; Delgado et al. 1994, Cordovilla et al. 1996; Zurayk et al. 1998; Garg, 2004; Rao et al. 2002; Tejera et al. 2004). Los resultados de este trabajo permitieron concluir que la inoculación de plantas de *P. vulgaris* con *B. phymatum* GR01N mejora la tolerancia de la fijación simbiótica de nitrógeno a salinidad en comparación con las plantas inoculadas con la cepa CIAT899R. Coincidiendo con nuestros resultados, un reciente estudio realizado por Mhadhbi et al. (2011) reveló que la inoculación de plantas de *P. vulgaris* con *E. meliloti* 4H41 aislada de suelos Tunecinos confirió a plantas de judía mayor tolerancia a la sequía que la inoculación con la cepa de referencia *R. etli* CIAT899. Nuestros resultados están de acuerdo con previos estudios que demostraron que la tolerancia a sal de los rizobios in vida libre contribuye a la tolerancia de la asociación simbiótica rizobio-leguminosa a este estrés (Miller-Williams et al. 2006; Domínguez-Ferreras et al. 2009a; Nogales et al. 2002).

Hoy en día se considera a los rizobios dentro de las *Alfaproteobacterias* inoculantes competitivos de cultivos de leguminosas sometidas a condiciones adversas (Graham, 2008). Recientes estudios realizados por Elliott et al. (2009), han propuesto a betaproteobacterias como simbiontes exclusivos de *Mimosa*. En este trabajo, se demuestra por primera vez la capacidad de *B. phymatum* dentro de las *Betaproteobacterias* para mejorar la tolerancia de *P. vulgaris* a salinidad, lo que nos estimuló a evaluar su capacidad competitiva para nodular judía bajo condiciones de salinidad en comparación con la cepa CIAT899R.

Los ensayos de la competitividad se llevaron a cabo mediante el uso de dos técnicas basadas en la resistencia a antibióticos o mediante detección de las cepas previamente marcadas con fluorocromos. Ambas técnicas demostraron ser buenas herramientas para la detección de poblaciones mixtas de rizobios (Sprigs y Dakora, 2009; Sturman et al. 2000). Estos experimentos demostraron que, en condiciones óptimas (control), la cepa GR01N de *B. phymatum* y la cepa GR60 que expresa la GFP colonizan efectivamente

las células de las raíces de plantas de judía en presencia de la cepas CIAT899R de *R. tropici* o CIAT61 que expresa DsRed. Sin embargo, en presencia de elevadas concentraciones de NaCl la capacidad de las dos cepas de *B. phymatum* para ocupar nódulos de judía fue mayor que la demostrada por las cepas de *R. tropici*.

En conclusión, los resultados del presente trabajo sugieren que, dada su osmotolerancia tanto en vida libre como en simbiosis, *B. phymatum* GR01N se propone como inoculante para mejorar el rendimiento del cultivo de judía en suelos afectados por salinidad.

5.3. Papel de la sobreexpresión de la oxidasa *cbb*₃ de *Rhizobium etli* en la respuesta de los nódulos de judía a sequía.

La fijación biológica de nitrógeno por la nitrogenasa es un proceso que requiere de un aporte considerable de ATP. Por ello, los bacteroides necesitan oxígeno para respirar y satisfacer las demandas energéticas de la nitrogenasa. Sin embargo, el complejo enzimático de la nitrogenasa es inactivado por el O₂, por lo que los nódulos han desarrollado estrategias fisiológicas para proteger a la nitrogenasa de su inactivación por O₂. Una de estas estrategias consiste en la expresión de una cadena de transporte de electrones cuya oxidasa terminal presenta una elevada afinidad por el O₂. En los bacteroides, es la citocromo oxidasa *cbb*₃ codificada por el operón *fixNOQP* la responsable de satisfacer los requerimientos energéticos de la nitrogenasa (Preisig et al. 1993). *R. etli* CFN42 posee de dos copias del operon *fixNOQP*, pero sólo la copia que se encuentra en el plásmido simbiótico se requiere para la fijación de nitrógeno (Girard et al. 2000). Estudios realizados por Miranda et al. (1996) y Silvente et al. (2002) demostraron que el aislamiento de mutantes de *R. etli* con mayor capacidad respiratoria incrementó la fijación simbiótica de N₂ en comparación con la cepa parental. Recientemente, Granados-Baeza et al. (2007) demostraron que, en *R. etli* la inactivación del regulador transcripcional de la familia Crp/Fnr denominado StoRd aumentó la expresión de la oxidasa terminal *cbb*₃ en los bacteroides de los nódulos de *P. vulgaris*, y confirió a las plantas una mayor capacidad de fijación de N₂ en comparación con la cepa silvestre.

Una de las respuestas de los nódulos frente a estreses ambientales, particularmente sequía, es el cierre de la BDO que resulta en una disminución del flujo de O₂ en los nódulos limitando la disponibilidad de oxígeno para la respiración bacteroidal. De

hecho, experimentos realizados en plantas de guisante demostraron que el tratamiento de las mismas con CINa redujo la capacidad respiratoria de los bacteroides (Delgado et al. 2003, 2004). Asimismo, se ha observado una reducción en la capacidad respiratoria en los bacteroides de plantas de soja sometidas a sequía (Díaz del Castillo y Layzell, 1995). De acuerdo con estas observaciones, los resultados de este trabajo han permitido demostrar un efecto inhibitorio de la sequía sobre la capacidad respiratoria de los bacteroides de nódulos de plantas de judía formados por la cepa *R. etli* CFN42.

En las simbiosis *Medicago truncatula*-*S. meliloti* (Aydi et al. 2004) y *Cicer arietinum*-*Mesorhizobium ciceri* (L'taief et al. 2007) se ha demostrado que la tolerancia de las plantas a la salinidad está asociada con un incremento en la permeabilidad o conductancia de oxígeno en los nódulos la cual contribuye a incrementar la respiración de oxígeno en los nódulos. Por todo ello, una posible estrategia a abordar para mejorar la tolerancia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa a la sequía o salinidad consistiría en la inoculación de la leguminosa con cepas de rizobios con mayor capacidad respiratoria. En el presente trabajo, se demuestra por primera vez que la inoculación de plantas de judía con la cepa CFN713 de *R. etli* que sobreexpresa la oxidasa terminal *cbb₃* alivia los efectos negativos de la sequía sobre la capacidad respiratoria de los bacteroides y aumenta la tolerancia de la fijación de N₂ a este estrés. Estos resultados nos permiten proponer la inoculación con cepas de rizobios que sobreexpresan la oxidasa *cbb₃* como una posible estrategia para mejorar la tolerancia de la simbiosis rizobio-leguminosa a la sequía.

Al contrario del efecto observado en la capacidad respiratoria de los bacteroides, el tratamiento de las plantas de judía con una sequía moderada provocó un aumento en la expresión de las proteínas FixP y FixO componentes de la oxidasa *cbb₃*. Dado que, en *R. etli* el operón *fixNOQPd* se induce en condiciones limitantes de oxígeno (Girard et al. 2000), podría ser posible que el aumento en la expresión de estos genes sea una respuesta a la disminución en la difusión de O₂ a los nódulos provocada por la sequía. A pesar de la inducción de la expresión de la *cbb₃* como respuesta temprana a la sequía, se observó una inhibición de la capacidad respiratoria de los bacteroides tras su aislamiento de los nódulos y posterior incubación en condiciones no limitantes de O₂. Esto sugiere que además del oxígeno pueden existir otras limitaciones metabólicas implicadas en el efecto negativo de la sequía sobre la capacidad respiratoria de los bacteroides tales como una limitación en el suministro de carbono a los bacteroides. De hecho, en este trabajo también se ha observado una inhibición de la actividad SS en los

nódulos de judía en respuesta a la sequía. La inoculación con la cepa CFNX713 que sobreexpresa la *cbb₃* alivió los efectos negativos de la sequía sobre la actividad de la SS.

Es sabido que los estreses ambientales tales como la sequía o salinidad regulan el funcionamiento de la SS disminuyendo la expresión de sus genes lo cual conduce a una disminución en su actividad (Gálvez et al. 2005; González et al. 1995, 1998; Gordon et al. 1997). En *P. vulgaris* se identificaron dos genes responsables de la síntesis de la SS (Silvente et al. 2003), uno de estos genes se expresa exclusivamente en los nódulos (*PvSSn*) mientras que el segundo se expresa en todos los tejidos analizados (*PvSS*). Los mismos estudios demostraron que la expresión del gen *PvSSn* depende en gran medida de la disponibilidad de C y esta mediado por el estado de los componentes del metabolismo nitrogenado en los nódulos de judía. En este trabajo, se ha demostrado que la inoculación de plantas de judía con la cepa CFNX713 que sobreexpresa la oxidasa *cbb₃* induce la expresión de los genes *PvSSn* en los nódulos. De acuerdo con nuestras observaciones, estudios previos realizados por Silvente et al. (2002) demostraron que la inoculación de plantas de judía con la cepa mutante CFN037 de *R. etli* con mayor capacidad respiratoria produjo una inducción de la actividad SS. Sin embargo, las diferencias observada en la actividad SS no se correlacionó con los niveles de transcripción de la SS. Hay que decir que en los trabajos de Silvente et al. et al (2002) no se pudo determinar la expresión específica del gen *PvSSn*, ya que las sondas utilizadas en los análisis no distinguían entre los dos genes *PvSSn* y *PvSS*.

La sacarosa se metaboliza en el citoplasma de las células infectadas por la enzima sacarosa sintasa para producir UDP-glucosa y fructosa que después de ser fosforilizadas por hexoquinasas, dirigen el flujo de carbono hacia la ruta glucolítica y posterior síntesis de malato el principal sustrato carbonado utilizado por los bacteroides. Una serie de estudios realizados en nódulos de soja (González et al. 1995, 1998) mostraron una severa inhibición de la SS como respuesta temprana a la sequía, a la que seguía un descenso del flujo glucolítico. Otros resultados realizados en plantas de guisante señalaron un descenso en los niveles de hexosas así como malato en los nódulos como respuesta a la sequía (Gálvez et al. 2005). De modo similar, los resultados de nuestro trabajo demostraron que la sequía produjo una severa disminución en el contenido de malato de los nódulos. La falta de malato en condiciones de sequía también podría deberse a la incapacidad del HCO_3^- para unirse al fosfoenolpiruvato (PEP) para formar oxalacetato y, posteriormente, malato. Sin embargo, los análisis de la actividad PEPC indicaron que esta actividad no se afectó en nuestros experimentos (datos no

mostrados). Aunque tanto la anhidrasa carbónica como la PEP carboxilasa (Schulze, 2004; Nomura et al. 2006) son esenciales para el funcionamiento de los nódulos, no se ha demostrado que su actividad esté afectada o desempeñe alguna función esencial en la respuesta a sequía (Coba de la Peña et al. 1997; Gálvez, 2000).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo sugieren que la disponibilidad de O₂ para mantener la respiración bacteroidal y a su vez la fijación de N₂ es el proceso principal implicado en la respuesta de los nódulos de judía a la sequía. De hecho, cuando estas plantas se inocularon con la cepa que sobreexpresa la oxidasa terminal *cbb₃* con mayor capacidad respiratoria, los efectos negativos de la sequía sobre la actividad SS y el contenido en malato en los nódulos es menos pronunciado que en los nódulos formados por la cepa silvestre.

Podemos concluir que una mayor eficiencia en el consumo de O₂ por los bacteroides podría ser la señal que modula la expresión de la enzima clave del metabolismo carbonado (SS), en respuesta a la sequía. Aunque durante bastante tiempo se ha asumido que las señales implicadas en la percepción y respuesta a la sequía se producían en la fracción vegetal de los nódulos, estos resultados sugieren que el metabolismo bacteroidal puede también contribuir a la respuesta de los nódulos a la sequía.

6. CONCLUSIONES

Primera. La *Betaproteobacteria Burkholderia phymatum* GR01 forma nódulos efectivos en simbiosis con *P. vulgaris*. Además, nodula a *Mimosa pigra*, *Acacia cochliacantha*, *Acacia bilimeki*, *Leucaena glauca* y *Prosopis laevigata*, y fija nitrógeno *ex planta*.

Segunda. En vida libre, la tolerancia a un estrés osmótico de *Burkholderia phymatum* GR01 es mayor que la de la cepa de referencia *R. tropici* CIAT899. En simbiosis con *Phaseolus vulgaris*, la inoculación con *B. phymatum* GR01 mejora la tolerancia a la salinidad respecto a las plantas inoculadas con *R. tropici* CIAT899.

Tercera. En condiciones de estrés salino, la competitividad de *Burkholderia phymatum* GR01 es mayor que la de *R. tropici* CIAT899.

Cuarta. *Burkholderia phymatum* GR01 acumula trehalosa, manitol y, alanina en respuesta a la salinidad.

Quinta. La sobreexpresión de la oxidasa *cbb₃* de *Rhizobium etli* aumenta la capacidad respiratoria de los bacteroides y mejora la tolerancia a la sequía en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*.

Sexta. En condiciones de sequía moderada, la actividad respiratoria de los bacteroides de *Rhizobium etli* podría ser una señal que regule el metabolismo del C en los nódulos de *Phaseolus vulgaris*.

7. BIBLIOGRAFÍA GENERAL

- Alamillo JA, Díaz-Leal JL, Sánchez-Moran MAV, Pineda M. 2010. Molecular análisis of ureide accumulation under drought stress in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Cell Environ.* 33:1828-1837.
- Amarger N, Marcheret V, Laguerre G. 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47:996-1006.
- Appleby CA. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 35:443-478.
- Arrese-Igor C, González EM, Gordon AJ, Minchin FR, Gálvez L, Royuela M, Cabrerizo PM, Aparicio-Tejo PM. 1999. Sucrose synthase and nodule nitrogen fixation under drought and other environment stresses. *Symbiosis.* 27:189-212.
- Arrese-Igor C, González EM, Marino D, Ladrera R, Larrainzar E, Gil-Quintana E. 2011. Physiological response of legumes nodules to drought. *Global Science Books. Plant Stress* 5:24-31 ISBN 978-4-903313-66-0.
- Aydi S, Drevon JJ, Abdelly C. 2004. Effect of salinity on root nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiol. Biochem.* 42:833-840.
- Aydi S, Sassi S, Abdelley C. 2008. Growth nitrogen fixation and ion distribution in *Medicago truncatula* subjected to salt stress. *Plant Soil.* 312:59-67.
- Baier MC, Barsch A, Küster H, Hohnjec N. 2007. Antisense-repression of the *Medicago truncatula* nodule-enhanced synthase leads to a handicapped nitrogen fixation mirrored by specific alterations in the symbiotic transcriptome and metabolome. *Plant Physiol.* 145:1600-1618.
- Bao Y, Lies DP, Fu H, Roberts GP. 1991. An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene.* 1:167-168
- Barrett CF, Parker MA. 2005. Prevalence of *Burkholderia* sp. Nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama. *Syst. Appl. Microbiol.* 28:57-65.
- Barrett CF, Parker MA. 2006. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:1198-1206.

- Baker A; Sprent J, Wilson J. 1995. "Effects of sodium chloride and mycorrhizal infection on the growth and nitrogen fixation of *Prosopis juliflora*". *Symbiosis*. 19: 39-51.
- Becana M, Klucas RV. 1992. Oxidation and Reduction of Leghemoglobin in Root Nodules of Leguminous Plants. *Plant Physiol*. 98:1217-1221.
- Becana M, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I. 1995. Structure and function of leghemoglobins *An. Estac. Exp. Aula Dei (Zaragoza)* 21:203-208.
- Becker A, Bergès H, Krol E, Bruand C, Rüberg S, Capela D, Lauber E, Meilhoc E, Ampe F, de Bruijn FJ, Fourment J, Francez-Charlot A, Kahn D, Küster H, Liebe C, Pühler A, Weidner S, Batut J. 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 17:292-303.
- Behrends V, Bundy JG, Williams HD. 2011. Differences in strategies to combat osmotic stress in *Burkholderia cenocepacia* elucidated by NMR-based metabolic profiling. *Let. Appl. Microbiol*. 52:619-25.
- Belitsky BR, Brill J, Bremer E, Sonenshein AL. 2001. Multiple genes for the last step of proline biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*. 183:4389-4392.
- Ben Romdhane S, Tajini F, Trabelsi M, Aouani ME, Mhamdi R. 2007. Competition for nodule formation between introduced strains of *Mesorhizobium ciceri* and native populations of rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum*) in Tunisia. *World. J. Microbiol. Biotechnol*. 23:1195-1201.
- Beringer JE. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol*. 84:188-98
- Bontemps C, Elliot GN, Simon MF, Dos Reis junior F, Gross E, Lawton R, Neto NE, Loureiro MF, Faria SM, Sprent JI, James EK, Young JPW. 2010. *Burkholderia* species are ancient symbionts of legumes. *Mol. Ecol*. 1:44-52.
- Bordeleau LM, Prévost D. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil*. 161:115-125.
- Botsford JL, Lewis TA. 1990. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl. Environ. Microbiol*. 56:488-494.
- Bouhmouch I, Brhada F, Filali-Maltouf A, Aurag J. 2001. Selection of osmotolerant and effective strains of *Rhizobiaceae* for inoculation of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Moroccan saline soils. *Agro*. 21:591-9.

- Bouhmouch I, Souad-Mouhsine B, Brhada F, Aurag J. 2005. Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *J. Plant Physiol.* 162:1103-1113.
- Bradley G, Juranka PF, Ling V. 1988. Mechanism of drug resistance. *Biochem. Biophys. Acta.* 948:87-128.
- Brouat A, Crouzet C. 1965. Notes techniques sur un appareil semiautomatique de clorage de l'azote et de certains composés volatiles. *Plant Physiol.* 58:438-446.
- Brown AD. 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40:803-846.
- Bueno E, Richardson DJ, Bedmar EJ, Delgado MJ. 2009. Expression of *Bradyrhizobium japonicum cbb₃* terminal oxidase under denitrifying conditions is subjected to redox control. *FEMS. Microbiol. Lett.* 298:20-28.
- Bühler D, Rossmann R, Landolt S, Balsiger S, Fischer HM, Hennecke H. 2010. Disparate pathways for the biogenesis of cytochrome oxidases in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 285:15704–15713.
- Caballero-Mellado, J, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Estrada-de los Santos P. 2004. *Burkholderia unamae* sp. nov., an N₂-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:1165-1172.
- Caballero-Mellado J, Onofre-Lemus J, Estrada-de los Santos P, Martínez-Aguilar L. 2007. The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:5308-5319.
- Callaham D, del Tredzci P, Torrey JG. 1978. Isolation and cultivation *in vitro* of the actinomycete causing root nodulation in *comptonia*. *science (washington, d.c.)*. 199: 899-902.
- Carpena R, Esteban E, Lucena JJ, Peñalosa J, Vázquez S, Zorzona P, Gárate A. 2006. Simbiosis y fitorrecuperación de suelos En: Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones. Bedmar EJ, González J, Lluch C, Rodelas B (eds). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). pp:255-268.
- Chang C, Damiani I, Puppo A, Frendo P. 2009. Redox changes during the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Mol. Plant* 2:370-377.
- Clark SRD, Oresnik IJ, Hynes MF. 2001. RpoN of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae strain VF39SM plays a central role in FnrN dependent microaerobic regulation of genes involved in nitrogen fixation. *Mol. Gen. Genet.* 264:623-633.

- Coba de la Peña T, Frugier F, McKhann HI, Bauer P, Brown S, Kondorosi A, Crespi M. 1997. A carbonic anhydrase gene is induced in the nodule primordium and its cell-specific expression is controlled by the presence of *Rhizobium* during development. *Plant J.* 11:407-420.
- Coenye T, Vandamme P. 2003. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. *Environ. Microbiol.* 5:719-729.
- Cordovilla MDP, Ligeró F, Lluch C. 1994. The effect of salinity on N₂ fixation and assimilation in *Vicia faba*. *J. Exp. Bot.* 45:1483-1488.
- Cordovilla MP, Ligeró F, Lluch C. 1996. Growth and nitrogen assimilation in nodules response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. *J. Exper. Bot.* 47:203-210.
- Cuin TA, Shabala S. 2005. Exogenously supplied compatible solutes rapidly ameliorate NaCl-induced potassium efflux from barley roots. *Plant Cell. Physiol.* 46:1924-1933.
- Cuin TA, Shabala S. 2007. Compatible solutes reduce ROS-induced potassium efflux in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell. Environ.* 30:875-885.
- Charlson DV, Korth KL, Purcell LC. 2009. Allantoate amidohydrolase transcript expression is independent of drought tolerance in soybean. *J. Exp. Bot.* 60:847-851.
- Chen WM, Moulin L, Bontemps C. 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* 185:7266-7272.
- Chen WM, de Faria SM, Stralioetto R, Pitard RM, Simoes- Araujo JL, Chou JH, Chou YJ, Barrios E, Prescott AR, Elliott GN, Sprent JI, Young JPW, James EK. 2005. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa* nodulating strains from South America. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7461-7471.
- Chen WM, James EK, Coenye T, Chou JH, Barrios E, de Faria SM, Elliott GN, Sheu SY, Sprent JI, Vandamme P. 2006. *Burkholderia mimosarum* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* spp. from Taiwan and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1847-1851.
- Chen, WM, de Faria SM, James E, Elliott GN, Lin KY, Chou JH, Sheu SY, Cnockaert M, Sprent JI, Vandamme P. 2007. *Burkholderia nodosa* sp. nov., isolated from root nodules of the woody Brazilian legumes *Mimosa bimucronata* and *Mimosa scabrella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57:1055-1059.

- Chen WM, de Faria SM, Chou JH, James EK, Elliott GN, Sprent JI, Bontemps C, Young JP, Vandamme P. 2008. *Burkholderia sabiae* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa caesalpiniiifolia*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58:2174-2179.
- da Costa MS, Santos H, Galinski EA. 1998. An overview of the role and diversity of compatible solutes in Bacteria and Archaea. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 61:117-153.
- de Bruijn FJ. 1992. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58:2180-2187.
- de Felipe MR. 2006. Fijación biológica de dinitrógeno en vida libre. En: Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones. Bedmar EJ, González J, Lluch C, Rodelas B (eds). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). pp:9-16.
- Delgado MJ, Olivares J, Bedmar EJ. 1989. Nitrate reductase activity of free living and symbiotic uptake hydrogenase-positive and uptake hydrogenase-negative strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 151:166-170.
- Delgado MJ, Bedmar EJ, Downie JA. 1998. Genes involved in the formation and assembly of rhizobial cytochromes and their role in symbiotic nitrogen fixation. Adv. Microb. Physiol. 40:193-223.
- Delgado MJ, Garrido JM, Ligeró F, Lluch C. 1993. Nitrogen fixation and carbon metabolism by nodules and bacteroids of pea plants under chloride stress. Physiol. Plant 89:824-829.
- Delgado MJ, Ligeró F, Lluch C. 1994. Effect of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba bean, common bean and soybean plants. Soil. Biol. Biochem. 26:371-376.
- Delgado MJ, Bonnard N, Tresierra-Ayala A, Bedmar EJ, Müller P. 2003. The *Bradyrhizobium japonicum napEDABC* genes encoding the periplasmic nitrate reductase are essential for nitrate respiration. Microbiol. 149:3395-3403.
- Demir Y, Kocakalican I. 2002. Effect of NaCl and proline on bean seedlings cultured in vitro. Biol. Plant 45:597-599.
- Díaz del Castillo L, Hunt S, Layzell DP. 2004. The role of oxygen in the regulation of nitrogenase activity in drought-stressed soybean nodules. Plant Physiol. 106:949-955.

- Díaz del Castillo L, Layzell DB. 1995. Drought stress, permeability to O₂ diffusion, and the respiratory kinetics of soybean root nodules. *Plant Physiol.* 107:1187-94.
- Díaz JR, Rosenberg R. 2008. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Rev. Science.* 321:926-929.
- Dixon R, Kahn D. 2004. Genetic regulation of the biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:621-631.
- Djekoun A, Planchon C. 1991. Water status effects on dinitrogen fixation and photosynthesis in soybean. *J. Agro.* 83:316-322.
- Domínguez-Ferreras A, Muñoz S, Olivares J, Soto MJ, Sanjuán J. 2009a. Role of potassium uptake systems in *Sinorhizobium meliloti* osmoadaptation and symbiotic performance. *J. Bacteriol.* 191:2133-2143.
- Domínguez-Ferreras A, Soto MJ, Pérez-Arnedo R, Olivares J, Sanjuán J. 2009b. Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* osmotolerance and nodulation of Alfalfa roots. *J. Bacteriol.* 191:7490-7499.
- Downie JA. 2005. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr. Biol.* 15:196-198.
- Dua RP. 1992. Differential response of chickpea (*Cicer arietinum*) genotypes to salinity. *J. Agr. Sci.* 119:367-71.
- Eardly BD, Wang FS, Whittam TS, Selander RK. 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.* 61:507-512.
- Elliott GN, Chen WM, Chou JH, Wang HC, Sheu SY, Perin L, Reis VM, Moulin L, Simon MF, Bontemps C, Sutherland JM, Bessi R, de Faria SM, Trinick MJ, Prescott AR, Sprent JI, James EK. 2007. *Burkholderia phymatum* is a highly effective nitrogen-fixing symbiont of *Mimosa* spp. and fixes nitrogen *ex planta*. *New. Phytol.* 173:168-180.
- Elliott GN, Chou JH, Chen WM, Bloemberg G, Bontemps C, Martínez-Romero E, Velázquez E, Young JPW, Sprent JI, James JK. 2009. *Burkholderia* spp. are the most competitive symbionts of *Mimosa*, particularly under N-limited conditions. *Environ. Microbiol.* 11:762-778.
- Estrada-de los Santos P, Bustillos-Cristales R, Caballero-Mellado J. 2001. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:2790-2798.

- Evelin H, Kapoor R, Giri B .2009. Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress. *J. Ann. Bot.* 104:1263-1280.
- FAO. 2005. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. FAO Land and Plant Nutrition Management Services, Rome, Italy. <http://www.fao.org/ag/agl/agll/spush>.
- Fernández-Aunión C, Ben Hamouda T, Iglesias-Guerra F, Argandoña M, Reina-Bueno M, Nieto JJ, Elarbi Aouani M, Vargas C. 2010. Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields *BMC. Microbiol.* 10:2-16.
- Fraysse N, Couderc F, Poinso V. 2003. Surface polysaccharid involment in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* 270:1365-1380.
- Frechilla S, González EM, Royuela M, Minchin FR, Aparecio-Tejo PM, Arrese-Igor C. 2000. Source of nitrogen nutrition (nitrogen fixation or nitrogen assimilation) is a major factor involved in pea response to moderate water stress. *J. Plant Physiol.* 157:609-617.
- Galinski EA, Trüper HG. 1994. Microbial behaviour in salt stressed ecosystems. *FEMS. Microbiol. Rev.* 15:95-108.
- Galinski EA. 1995. Osmoadaptation in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 37:273-328.
- Gálvez S, Hirsch AM, Wycoff KL, Hunt S, Layzell DB, Kondorosi A, Crespi M. 2000. Oxygen regulation of a nodule-located carbonic anhydrase in alfalfa. *Plant Physiol.* 124:1059-1068.
- Gálvez L, González EM, Arrese-Igor C. 2005. Evidence for carbon flux shortage and carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. *J. Exper. Bot.* 56:2551-1561.
- García-Esteba R, Argandoña M, Reina-Bueno M, Capote N, Iglesias-Guerra F, Nieto JJ, Vargas C. 2006. The *ectD* gene, which is involved in the synthesis of the compatible solute hydroxyectoine, is essential for thermoprotection of the halophilic bacterium *Chromohalobacter salexigens*. *J. Bacteriol.* 88:3774-3784.
- Garg N, Singla R. 2004. Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress. *Braz. J. Plant Physiol.* 16:137-146.
- Gepts P, Bliss FA. 1988. Dissemination pathways of common bean (*Phaseolus vulgaris*, *Fabaceae*) deduced from phaseolin electrophoretic variability II Europe and Africa. *Econ. Bot.* 42:86-104.

- Gepts P. 1990. Biochemical evidence bearing on the domestication of *Phaseolus* (*Fabaceae*) beans. *Econ. Bot.* 44:28-38.
- Gillis M, Van Van T, Bardin R, Goor M, Hebbar P, Willems A, Segers P, Kersters K, Heulin T, Fernandez MP. 1995. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:274-289.
- Girard L, Brom S, Dávalos A, López O, Soberón M, Romero D. 2000. Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 13:1283-1292.
- González EM, Gordon AJ, James CL, Arrese-Igor C. 1995. The role of sucrose synthase in the response of soybean nodules to drought. *J. Exp. Bot.* 46:1515-1523.
- González EM, Aparicio-Tejo PM, Gordon AJ, Minchin FR, Royuela M, Arrese-Igor C. 1998. Water-deficit effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules. *J. Exp. Bot.* 49:1705-1714.
- González EM, Gálvez L, Arrese-Igor C. 2001a. Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *J. Exp. Bot.* 52:285-293.
- González EM, Gálvez L, Royuela M, Aparicio-Tejo PM, Arrese-Igor C. 2001. Insight into the regulation of nitrogen fixation in pea nodules: lessons from drought, abscisic acid and increased photoassimilate availability. *Agro.* 21:607-613.
- González EM, Gálvez L, Marino D, Ladrera L, Larrainzar E, Arrese-Igor C. 2006. Metabolismo carbonado y nitrogenado en nódulos. En: Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones. Bedmar EJ, González J, Lluch C, Rodelas B (eds). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). pp:255-268.
- Gordon AJ, Minchin FR, James CL, Komina O. 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 120:867-877.
- Gordon AJ, Minchin FR, Skot L, James CL. 1997. Stress induced declines in soybean N₂ fixation are related to nodule sucrose activity. *Plant Physiol.* 114:937-946
- Goris J, De Vos P, Caballero-Mellado J, Park J, Falsen E, Quensen JF, Tiedje JM, Vandamme P. 2004. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. nov. *Int J Syst. Evol. Microbiol.* 54:1677-1681.

- Graham PH. 1981. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: a review. *Field Crop Res.* 4:93-112.
- Graham PH, Draeger KJ, Ferrey ML, Conroy MJ, Hammer BE, Martinez E, Aarons SR, and Quinto C. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. *Can. J. Microbiol.* 40:198-207.
- Graham PH, Vance CP. 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Res.* 65:93-106.
- Graham PH, Vance CP. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiol.* 131:872-877.
- Graham PH. 2008. Ecology of the rooy-nodule bacteria of legumes In: Nitrogen-fixing Leguminous Symbiosis. Dilworth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds). Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp:23-43.
- Granados-Baeza MJ, Gómez-Hernández N, Mora Y, Delgado MJ, Romero D, Girard L. 2007. Novel Reiterated Fnr-Type Proteins Control the Production of the Symbiotic Terminal Oxidase *cbb₃* in *Rhizobium etli* CFN42. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 20:1241-1249.
- Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen WM, Elliott GN, Bontemps C, Estrada-de los Santos P, Gross E, Bueno dos Reis FJ, Sprent JI, Young PW, Euan KJ. 2011. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range and future prospects. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 1-43.
- Hardarson G. 1993. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. *Plant Soil.* 152:1-17.
- Hartwig UA. 1998. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. *Perspectives in Plant Ecology. Evol. Syst.* 1:92-120.
- Herold S, Puppo A. 2005. Oxyleghemoglobina scavenges nitrogen monoxide and peroxy nitrite: a possible role in functioning nodules? *J. Biol. Inorg. Chem.* 10:935-945.
- Herrera-Cervera JA, Caballero-Mellado J, Laguerre G, Tichy HV, Requena N, Amarger N, Martínez-Romero E, Olivares J, Sanjuan J. 1999. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 30:87-97.

- Hilali A, Aurag J, Molina JAE, Schmidt EL. 1989. Competitiveness and persistence of strains of *Rhizobium phaseoH* introduced into a Moroccan sandy soil. *Biol. Fertil. Soil.* 7:213-218.
- Horst I, Welham T, Kelly S, Kaneko T, Sato S, Tabata S, Parniske M, Wang TL. 2007. TILLING mutants of *Lotus japonicum* reveal that nitrogen assimilation and fixation can occur in the absence of nodule-enhanced sucrose synthase. *Plant Physiol.* 144:806-820.
- Hu Y, Schmidhalter U. 2002. Limitation of salt stress to plant growth. En: *Plant toxicology*. Hock B, Elstner CF (eds). Marcel Dekker Inc. New York. pp:91-224.
- Hunt S y Layzell DB. 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44:483-511.
- Iannetta PPM, James EK, McHardy PD, Sprent JI, Minchin FR. 1993. An ELISA procedure for quantification of relative amounts of intercellular glycoprotein in legume nodules. *Ann. Bot.* 71:85-90
- Iannetta PPM, James EK, Sprent JI, Minchin FR. 1995. Time course of changes involved in the operation of the oxygen diffusion barrier in white lupin nodules. *J. Exp. Bot.* 46: 565-575.
- Imperial J, Palacios JM, Brito B, Rey L, Cabrera E, Ureta AC, Ruiz Argüeso T. 2006. El sistema hidrogenasa de las bacterias que nodulan leguminosas. En: *Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones*. Bedmar EJ, González J, Lluch C, Rodelas B (eds). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). pp:35-44.
- Ishii S, Sadowsky MJ. 2009. Application of the rep-PCR DNA fingerprinting technique to study microbial diversity ecology and evolution. *Environ. Microbiol.* 11:733-740.
- Jadhav GG, Salunkhe DS, Nerkar DP, Bhadekar RK. 2010. Isolation and characterization of salt-tolerant nitrogen-fixing microorganisms from food. *J. Eur. Asia. Bio. Sci.* 4: 33-40.
- Jones KM, Kobayashi H, Davies BW, Taga ME, Walker GC. 2007. How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat. Rev. Microbiol.* 5: 619-633.
- Jourand P, Giraud I, Béna G, Abdoulay SY, Willems A, Gillis M, Dreyfus B, de Lajudie P. 2004. *Methylobacterium nodulans* sp. nov., for a group of aerobic,

- facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2269-2273.
- Jukes TH, Cantor CR. 1969.. Mammalian protein metabolism In: Evolution of protein molecules. Munro HN (ed). Academic Press, New York, NY. pp:21-132.
- Kahn D, David M, Domergue O, Daveran ML, Ghai J, Hirsch PR, Batut J. 1989. *Rhizobium meliloti fixGHI* sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 171:929-939.
- Kessler B, de Lorenzo V, Timmis KN. 1992. A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram negative eubacteria: regulation of *Pm* promoter in the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol. Gen. Genet.* 233:293-301.
- Khadri M, Pliego L, Soussi M, Lluch C, Ocaña A. 2001. Ammonium assimilation and ureide metabolism in common bean (*P. vulgaris*) nodules under salt stress. *Agro.* 21: 635-64.
- King CA, Purcell LC. 2005. Inhibition of N₂ fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. *Plant Physiol.* 137:1389-1396.
- Koch B, Jensen LE, Nybroe O. 2001. A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. *J. Microbiol. Methods.* 45:187-195.
- Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Arizona State University, Tempe, AZ.
- Ladrera R, Marino D, Larrainzar E, González EM, Arrese-Igor C. 2007. Reduced carbon availability to bacteroids and elevated ureids in nodules, but not in shoots, are involved in the nitrogen fixation response to early drought in soybean. *Plant Physiol.* 145:539-546.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T₄. *Nat.* 227:680-685.
- Lambertsen L, Sternberg C, Molin S. 2004. Mini-Tn7 transposons for site-specific tagging of bacteria with fluorescent proteins. *Environ. Microbiol.* 6:726-732.
- Larrainzar E, Wienkoop S, Scherling C, Kempa S, Ladrera R, Arrese-Igor C, González EM. 2007. *Medicago truncatula* root nodule proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Plant Physiol.* 144:1495-1507.
- Larrainzar E, Wienkoop S, Scherling C, Kempa S, Ladrera R, Arrese-Igor C, Weckwerth W and González EM. 2009. *Medicago truncatula* root nodule

- proteome analysis reveals differential plant and bacteroid responses to drought stress. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 22:1565–1576.
- LaRue TA, Child JJ. 1979. Sensitive fluorometric assay for leghaemoglobin. *Anal. Biochem.* 92:11-15.
- Laüchli A. 1984. Salt exclusion: An adaptation of legumes for crops and pastures under saline conditions. In: *Salinity tolerance in plants-strategies for crop improvement*. Staples RC, Toenniessen GH (eds). Wiley, New York. pp:171-188.
- Leonard LT. 1943. A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* 45:523-527.
- Liesack W, Janssen PH, Rainey FA, Ward-Rainey NL, Stackebrandt E. 1997. Microbial diversity in soil: the need for a combined approach using molecular and cultivation techniques. In: *Modern Soil Microbiology*. Van Elsas JD, Trevors JT and Wellington EMH (eds). New York: Marcel Dekker. pp:375-439.
- Lodwig EM, Hosie AHF, Bourdès K, Findlay K, Allaway D, Karunakaran R, Downie JA, Poole PS. 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nat.* 422:722-726.
- López O, Morera C, Miranda-Ríos J, Girard L, Romero D, Soberón M. 2001. Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: Role of FnrN in *fixNOQP* expression and in symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 183:6999-7006.
- L'taiefa B, Sifib B, Zaman-Allah M, Drevon JJ, Lachaâla M. 2007. Effect of salinity on root-nodule conductance to the oxygen diffusion in the *Cicer arietinum*-*Mesorhizobium ciceri* symbiosis. *J. Plant Physiol.* 164:1028-1036.
- Manchanda G, Garg N. 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. Springer, *Rev. Acta. Physiol. Plant.* 30:595-618.
- Mandon K, Kaminski PA, Elmerich C. 1994. Functional analysis of the *fixNOQP* region of *Azorhizobium caulinodans*. *J. Bacteriol.* 176:2560- 2568.
- Marino D, González EM, Arrese-Igor C. 2006. Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulation pathways under oxidative stresses. *J. Exp. Botan.* 57:665-673.

- Marino D, Frendo P, Ladrera R, Zabalza A, Puppo A, Arrese-Igor C, González EM. 2007. Nitrogen fixation control under drought stress: localized or systemic?. *Plant Physiol.* 146:1968-1974.
- Marino D, Hohnjec N, Küster H, Moran JF, González EM, Arrese-Igor C. 2008. Evidence for transcriptional and post-transcriptional regulation of sucrose synthase in pea nodules by the cellular redox state. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 21:622-630.
- Marino D, Pucciariello C, Puppo A, Frendo P. 2009. The redox state, a reference of the legume-rhizobia symbiotic game. *Adv. Botan. Res.* 52:115-158.
- Marroquí S, Zorreguieta A, Santamaría C, Temprano F, Soberón M, Megías M, Downie JÁ. 2001. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants. *J. Bacteriol.* 183:854-64.
- Martínez-Aguilar L, Díaz R, Peña-Cabriales JJ, Estrada-de los Santos P, Dunn MF, Caballero-Mellado J. 2008. Multichromosomal genome structure, confirmation of diazotrophy in novel plant-associated *Burkholderia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4574-4579.
- Martínez-Romero E, Segovia L, Mercante FM. 1991. *Rhizobium tropici*, a novel nodulating *Phaseolus vulgaris* L. bean and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:417-426.
- Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J. 1996. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Revs. Plant Sci.* 15: 115-140.
- McIntyre HJ, Davies H, Hore TA, Miller SH, Dufour JP, Ronson CW. 2007. Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3984-3992.
- Meakin GE, Bueno E, Jepson B, Bedmar EJ, Richardson DJ, Delgado MJ. 2007. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiol.* 153:411-419.
- Mesa S, Alché JD, Bedmar EJ, Delgado MJ. 2004. Expression of *nir*, *nor* and *nos* denitrification genes from *Bradyrhizobium japonicum* in soybean root nodules. *Physiol. Plant.* 120:205-211.
- Mesa S, Ucurum Z, Hennecke H, Fischer HM. 2005. Transcription activation in vitro by the *Bradyrhizobium japonicum* regulatory protein FixK2. *J. Bacteriol.* 187:3329-3338.

- Meuelenberg F, Dakora FD. 2007. Assessing the biological potential of N₂-fixing leguminosae in Botswana for increased crop yields and commercial exploitation. *Afr. J. Biotechnol.* 6:325-334.
- Mhadhbi H, Jebara M, Zitoun A, Limam F, Aouani ME. 2008. Symbiotic effectiveness and response to mannitol-mediated osmotic stress of various chickpea-rhizobia associations. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24:1027-1035.
- Mhadhbi H, Fotopoulos V, Djebali N, Polidoros AN, Aouano ME. 2009. Behaviour of *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* symbiosis under osmotic stress in relation with symbiotic partner input: effect on nodule functioning and protection. *J. Agro. Crop. Sci.* 195:225-231.
- Mhadhbi H, Chihaoui S, Mhamdi R, Mnasri B, Jebara M, Mhamdi R. 2011. A highly osmotolerant rhizobial strain confers a better tolerance of nitrogen fixation and enhances protective activities to nodules of *Phaseolus vulgaris* under drought stress. *Af. J. Biotechnol.* 10:4555-4563.
- Mhamdi R, Laguerre G, Aouani ME, Mars M, Amarger N. 2002. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 41:77-84.
- Miller J H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Miller-Williams M, Loewen PC, Oresnik IJ. 2006. Isolation of salt-sensitive mutants of *Sinorhizobium meliloti* strain Rm1021. *Microbiol.* 152:2049-2059.
- Minchin FR, Thomas BJ, Mytton LR. 1995. Ion distribution across the cortex of soybean nodules: Possible involvement in control of oxygen diffusion. *Ann. Bot.* 74:613-617.
- Minchin FR. 1997. Regulation of oxygen diffusion in legume nodules. *Soil. Biol. Biochem.* 29:881-888.
- Minchin FR, James, EK, Becana M. 2008. Oxygen diffusion, production of reactive oxygen and nitrogen species and antioxidants in legume nodules In: *Nitrogen-Fixing Leguminous Symbioses*. Dilworth MJ, James EK, Sprent JI and Newton WE (eds). Springer Sci. pp:321-362.
- Miranda J, Membrillo-Hernández J, Tabche ML, Soberón M. 1996. Rhizobium etli cytochrome mutants with depressed expression of cytochrome terminal oxidases and enhanced symbiosis nitrogen accumulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45:182-188.

- Mnasri B, Mrabet M, Laguerre G, Aouani ME, Mhamdi R. 2007. Salttolerant rhizobia isolated from a Tunisian oasis that are highly effective for N₂-Fixation with *Phaseolus vulgaris* constitute a novel biovar (*bv. mediterranense*) of *Sinorhizobium meliloti*. Arch. Microbiol. 187: 79-85
- Morell M, Copeland L. 1984. Enzymes of sucrose breakdown in soybean nodules. Alkaline invertase. Plant Physiol. 74:1030-1034.
- Morell M, Copeland L. 1985. Sucrose synthase in soybean nodules. Plant Physiol. 78:149-154
- Morón B, Soria-Díaz ME, Ault J, Verroios G, Noreen S, Rodríguez-Navarro DN, Gil-Serrano A, Thomas-Oates J, Megías M and Sousa C. 2005. Low pH Changes the Profile of Nodulation Factors Produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. Chem. Biol. 12:1029-1040.
- Morón B, Dardanelli MS, Sousa C, Megías M. 2006. Diálogo molecular en la simbiosis rizobio-leguminosa En: Fijación biológica de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones. Bedmar EJ, González J, Lluch C, Rodelas B (eds). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). pp:160-171.
- Moulin L, Munive A, Dreyfus B, Boivin-Masson C. 2001. Nodulation of legumes by members of the subclass of proteobacteria. Nat. 411:948-950.
- Mulley G, Lopez-Gomez M, Zhang Y, Terpolilli J, Prell J, Finan T, Poole P. 2010. Pyruvate is synthesized by two pathways in pea bacteroids with different efficiencies for nitrogen fixation. J. Bacteriol. 192:4944-4953.
- Mulley G, White JP, Karunakaran R, Prell J, Bourdes A, Bunnewell S, Hill L, Poole PS. 2011. Mutation of GOGAT prevents pea bacteroid formation and N₂ fixation by globally downregulating transport of organic nitrogen sources. Mol. Microbiol. 80:149-167.
- Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell. Environ. 25:239-250.
- Munns R. 2005. Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytol. 167:645-663.
- Munns R, Tester M. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. Ann. Rev. Plant Biol. 59:651-681.
- Naya L, Ladrera R, Ramos J, González EM, Arrese-Igor C, Minchin FR, Becana M. 2007. The response of carbon metabolism and antioxidant defenses of alfalfa nodules to drought stress and to subsequent recovery of plants. Plant Physiol. 114:1104-1114.

- Nayyar H, Bains T, Kumar S, Kaur G. 2005. Chilling effects during seed filling on accumulation of seed reserves and yield of chickpea. *J. Sci. Food. Agric.* 85:1925-1930.
- Noel KD, Sánchez F, Fernández L, Leemans L, Cevallos MA. 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J Bacteriol* 158:148-155.
- Nogales J, Campos R, Ben Abdelkhalek H, Olivares J, Lluch C, Sanjuan J. 2002. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*, *Mol. Plant-Microb. Interact.* 15:225-232.
- Nomura M, Mai HT, Fujii M, Hata S, Izui K, Tajima S. 2006. Phosphoenol-pyruvate carboxylase plays a crucial role limiting nitrogen fixation in *Lotus japonicus* nodules. *Plant Cell. Physiol.* 47:613-621.
- Odeh IOA, Onus A. 2008. Spatial analysis of soil salinity and soil structural stability in a semi-arid region of NSW, Australia. *Environ. Manag.* 42: 265-278.
- Oldroyd GED, Downie JA. 2008. Coordination nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59:519-546.
- Oren A. 1999. Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:334-348.
- Oldroyd GED, Murray JD, Poole PS, Downie JA. 2011. The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. *Ann. Rev. Genet.* 45:119-44.
- Ott T, van Dongen JT, Gunther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Curr. Biol.* 15:531-535.
- Ott T, Sullivan J, James EK, Flemetakis E, Günther C, Gibon Y, Ronson C, Udvardi M. 2009. Absence of symbiotic leghemoglobins alters bacteroid and plant cell differentiation during development of *Lotus japonicus* root nodules. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 22:800-808.
- Parsons R, Stanforth A, Raven JA, Sprent JI. 1993. Nodules growth and activity may be regulated by a feedback mechanism involving phloem nitrogen. *Plant Cell. Environ.* 16:125-136.
- Perin L, Martínez-Aguilar L, Castro-González R, Estrada-de los Santos P, Cabellos-Avelar T, Guedes HV, Reis VM, Caballero-Mellado J. 2006a. Diazotrophic

- Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane. Appl. Environ. Microbiol. 72:3103-3110.
- Perin L, Martínez-Aguilar L, Paredes-Valdez G, Baldani JJ, Estrada-de los Santos P, Reis VM, Caballero-Mellado J. 2006. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugar cane and maize. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 152:95-103.
- Philippot L, Hallin S, Schloter M. 2007. Ecology of dinitrifying prokaryotes. In: agricultural soil. Sparks DL (ed). Adv. agro. pp:249-304.
- Poly F, Monrozier LJ, 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.
- Prasad TK, Anderson MD, Martin BA, Stewart CR. 1994. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. Plant Cell. 6:65-74.
- Preisig O, Anthamatten D, Hennecke H. 1993. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 90:3309-3313.
- Preisig O, Zufferey R, Hennecke H. 1996a. The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* are required for the formation of the high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase. Arch. Microbiol. 165:297-305.
- Preisig O, Zufferey R, Hennecke H. 1996b. The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* are required for the formation of the high-affinity *cbb₃*-type cytochrome oxidase. Arch. Microbiol. 165:297-305.
- Priefer UB, Aurag J, Boesten B, Bouhmouch I, Defez R, Filali-Maltouf A, Miklis M, Moawad H, Mouhsine B, Prell J, Schlüter A, Senatore B. 2001. Characterisation of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. J. Bacteriol. 91: 223–236.
- Purcell LC, Serraje R, de Silva M, Sinclair TR, Bona S. 1998. Ureide concentration of field-grown soybean in response to drought and the relationship to nitrogen fixation. J. Plant Nut. 21:949-966.
- Purcell LC. 2009. Physiological response of N₂ fixation to drought and selecting genotypes for improved N₂ fixation. In: Nitrogen fixation in crop production. Emirich DW, Krishnan HB (eds). ASA, CSSA and SSSA, Madison WI. pp:211-238.

- Ramos LMG, Boddey RM. 1987. Yield and nodulation of *Phaseolus vulgaris* and the competitiveness of an introduced *Rhizobium* strain: effects of lime, mulch and repeated cropping. *Soil. Biol. Chem.* 19:171-177.
- Ramos MLG, Gordon AJ, Minchin FR, Sprent JI, Parsons R. 1999. Effect of water stress on nodule physiology and biochemistry of a drought tolerant cultivar of common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Ann. Bot.* 83:57-63.
- Rao DL, Giller N, Yeo KE, Flowers TJ. 2002. The Effects of Salinity and Sodidity upon Nodulation and Nitrogen Fixation in Chickpea (*Cicer arietinum*). *Ann. Bot.* 89:563-570.
- Rasband WS. 1997. ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsbinfo.nih.gov/ij/>.
- Rasolomampianina R, X Bailly, R Fetiarison, R Rabevohitra, G Béna, L Ramarason, M Raherimandimby, L Moulin. P De Lajudie, B Dreyfus, Avarre JC. 2005. Nitrogen-fixing nodules from rose wood legume trees (*Dalbergia* spp.) endemic to Madagascar host seven different genera belonging to alpha- and beta-Proteobacteria. *Mol. Ecol.* 14:4135-4146.
- Regensburger B, Hennecke H. 1983. RNA polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Arch. Microbiol.* 135:103-109.
- Reis VM, Estrada-de los Santos P, Tenorio-Salgado S, Vogel J, Stofels M, Guyon S, Mavingui P, Baldani VLD, Schmid M, Baldani JI, Balandreau J, Hartmann A, Caballero-Mellado J. 2004. *Burkholderia tropica* sp nov, a novel nitrogen-fixing, plant associated bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54:2155-2162.
- Rengasamy P .2006. World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.* 57:1017-1023
- Riccillo PM, Collavino MM, Grasso DH, England R, de Bruijn FJ, Aguilar OM. 2000. A *guaB* mutant of *Rhizobium tropici* CIAT899 pleiotropically defective in thermal tolerance and symbiosis. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 13:1228-1236.
- Rigaud J, Puppo A. 1975. Indole-3 acetic catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Bacteriol.* 88:223-228.
- Rivas R, Willems A, Suba-Rao NS, Mteos PF, Dazzo FB, Kroppenstedt RM, Martinez-Molina E, Gillis M, Velázquez E. 2003. Description of *Devosia neptuniae* sp. nov. that nodulates and fixes Nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from india. *Sys. Appl. Microbiol.* 26:47-53.

- Rivas R, Willems A, Palomo JL, García-Benavides P, Mateos PF, Martínez-Molina E, Gillis M, Velázquez E. 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumore-like deformations. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54:1271-1275.
- Rivas R, García-Fraile P, Velázquez E. 2009. Taxonomy of bacteria nodulating legumes. Rev. Microbiol. Insight 2:251-269.
- Rivas R, García-Fraile P, Velázquez E. 2011. Taxonomía y filogenia de los rhizobia. En: Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos. Mejías MG, Rivilla RP, Soto MJ, Delgado MJ, González E, Mateos PF, León M, Rodelas B Bedmar EJ (eds). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). pp:255-267.
- Robledo M, Jimenez-Zurdo JI, Velázquez E, Trujillo ME, Zurdo-Pineiro JL, Ramirez-Bahena MH, Ramos B, Diaz-Minguez JM, Dazzo F, Martinez-Molina E, Mateos PF. 2008. *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 105:7064-7069.
- Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Soto MJ, Velázquez E, Dazzo F, Martínez-Molina E, Mateos PF. 2011. Development of functional symbiotic with clover rooy hairs and nodule requiers tightly regulated production of rhizobial cellulase CelC2. Mol. Plant-Microb. Interact. 24:798-807.
- Rodiño AP, de la Fuente M, González AM, de Ron AM y Santalla M. 2011. Diversidad de las leguminosas en Europa y España. En: Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos. Mejías MG, Rivilla RP, Soto MJ, Delgado MJ, González E, Mateos PF, León M, Rodelas B Bedmar EJ (eds). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). pp:19-34.
- Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4:406-425.
- Sambrook J, Russell DW. 2004. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3^d ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd ed. N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press. p:1659. ISBN 0-87969-309-6.
- Sánchez C, Gates AJ, Meakin GE, Uchiumi T, Girard L, Richardson DJ, Bedmar EJ, Delgado MJ. 2010. Production of nitric oxide and nitrosylhemoglobin

- complexes in soybean nodules in response to flooding. *Mol. Plant-Microb. Interact.* 23:702-711.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gomes M, Romero-Puertas M, del Rio LA. 2001. Cadmium- induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52:2115-2126.
- Santos H, da Costa MS. 2002. Compatible solutes of organisms that live in hot saline environments. *Environ. Microbiol.* 4:501-509.
- Sassi S, González EM, Aydi S, Arrese-Igor C, Abdelly C. 2008. Tolerance of common bean to long-term osmotic stress is related to nodule carbon flux and antioxidant defenses: evidence from two cultivars with contrasting tolerance. *Plant Soil.* 312:39-48.
- Sawada H, Kuykendall LD, Young JM. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49:155-179.
- Schulze J. 2004. How are nitrogen fixation rates regulated in legumes?. *J. Plant Nut. Soil. Sci.* 167:125-137.
- Segovia L, Young JPW, Martínez-Romero E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43:374-377.
- Serraj R, Fleurat-Lessard P, Jaillard B, Drevon JJ. 1995. Structural changes in the inner-cortex cells of soybean root nodules are induced by short-term exposure to high salt or oxygen concentrations. *Plant Cell. Environ.* 18: 455-462.
- Serraj R, Sinclair TR. 1996a. Processes contributing to N₂-fixation insensitivity to drought in the soybean cultivar Jackson. *Crop. Sci.* 36:961-968.
- Serraj R, Vadez V, Denison RF, Sinclair TR. 1999b. Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. *Plant Physiol.* 119:289-296.
- Serraj R. 2002. Response of symbiotic nitrogen fixation to drought and salinity stresses. *Physiol. Mol. Biol.* 8:77-86
- Serraj R. 2003. Effect of drought stress on legume symbiotic nitrogen fixation: physiological mechanisms. *Ind. J. Exp. Biol.* 41:1136-1141.
- Shamseldin A, Werner D. 2005. High salt and high pH tolerance of new isolated *Rhizobium etli* strains from Egyptian soils. *Curr. Microbiol.* 50:11-16.
- Shiraishi A, Matsushita M, Hougetsu T. 2010. Nodulation in black locust by the Gammaproteobacteria *Pseudomonas* sp and the Betaproteobacteria *Burkholderia* sp. *Syst. Appl. Microbiol.* 33:269-274.

- Silvente S, Blanco L, Camas A, Ortega JL, Ramirez M, Lara-Flores M. 2002. *Rhizobium etli* mutant modulates carbon and nitrogen metabolism in *Phaseolus vulgaris* nodules. Mol. Plant Microb. Interact. 15:728-733.
- Silvente S, Camas A, Lara M. 2003. Heterogeneity of sucrose synthase genes in bean (*Phaseolus vulgaris* L): Evidence for a nodule-enhanced sucrose synthase gene. J. Exp. Bot. 54:749-755.
- Sleator RD, Hill C. 2001. Bacterial osmoadaptation: The role of osmolytes in bacterial stress and virulence. FEMS. Microbiol. Rev. 26:49-71.
- Schlüter A, Patschkowski T, Quandt J, Selinger LB, Weidner S, Kramer M, Zhou L, Hynes MF., Priefer UB. 1997. Functional and regulatory analysis of the two copies of the *fixNOQP* operon of *Rhizobium leguminosarum* strain VF39. Mol. Plant-Microb. Interact. 10:605-616.
- Smith LT, Pocard JA, Bernard-Smith LT, Smith GM. 1989. An osmoregulated dipeptide in stressed *Rhizobium meliloti*. J. Bacteriol. 171:4714-4717.
- Smith LT, Smith GM, Madkour MA. 1990. Osmoregulation in *Agrobacterium tumefaciens*: accumulation of a novel disaccharide is controlled by osmotic strength and glycine betaine. J. Bacteriol. 172:6849-6855.
- Sprent JI. 2001. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew. pp146.
- Spriggs AC, Dakora FD. 2009. Assessing the suitability of antibiotic resistance markers and the indirect ELISA technique for studying the competitive ability of selected *Cyclopia* Vent. rhizobia under glasshouse and field conditions in South Africa. BMC. Microbiol. 9:1-11.
- Streeter JG. 1988. Inhibition of legumes nodule formation and N₂ fixation by nitrate. Crit. Rev. Plant Sci. 7:1-23.
- Strøm AR, Kaasen I. 1993. Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. Mol. Microbiol. 8:205-210.
- Stuurman N, Pacios Bras C, Schlaman HRM, Wijfjes AHM, Bloemberg G, Spaik HP. 2000. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. Mol. Plant-Microb. Interact. 13:1163-1169.
- Suárez R, Wong A, Ramírez M, Barraza A, Orozco MC, Cevallos MA, Lara M, Hernández G, Iturriaga G. 2008. Improvement of drought tolerance and grain yield in common bean by overexpressing trehalose-6-phosphate synthase in rhizobia. Mol. Plant-Microb. Interact. 21:958-966.

- Sugawara M, Cytryn EJ, Sadowsky MJ. 2010. Functional role of *Bradyrhizobium japonicum* trehalose biosynthesis and metabolism genes during physiological stress and nodulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:1071-1081.
- Talbi C, Delgado MJ, Girard L, Ramírez-Trujillo A, Caballero-Mellado J, Bedmar EJ. 2010. *Burkholderia phymatum* strains capable of nodulating *Phaseolus vulgaris* are present in Moroccan soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4587-91.
- Tejera NA, Campos R, Sanjuan J, Lluch C. 2004. Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *J. Plant physiol.* 161:329-338.
- Tejera NA, Soussi M, LLuch C. 2006. Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. *Environ. Exp. Bot.* 58:17-24.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680.
- Thummler F, Verma DP. 1987. Nodulin-100 of soybean is the subunit of sucrose synthase regulated by the availability of free heme in nodules. *J. Biol. Chem.* 262:14730-6.
- Trujillo EM, de la Vega PA, Garcia CL, Hidalgo MP, Martínez-Molina E. 2011. Actinobacterias endofitas de raíces y nódulos fijadores de nitrógeno: papael ecológico y potencial biotecnológico. En: *Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos*. Mejías MG, Rivilla RP, Soto MJ, Delgado MJ, González E, Mateos PF, León M, Rodelas B Bedmar EJ (eds). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). pp:297-312.
- Trujillo EM. 2008. Actinobacterias. En: *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley and Sons. Ltd.
- Tu JC. 1981. Effect of salinity on *Rhizobium*-root hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Cana. J. Plant Sci.* 6:231-9.
- Tuteja N. 2007. Mechanisms of high salinity tolerance in plants. *Meth. Enzymol.* 428:419-438.
- Valdés M, Pérez NO, Estrada-de los Santos P, Caballero-Mellado J, Peña-Cabriaes JJ, Normand P, Hirsh AM. 2005. Non-*Frankia* actinomycetes isolated from surface-

- sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:460-466.
- Valdés-López O, Arenas-Huertero C, Ramírez M, Girard L, Sánchez F, Vance CP, Reyes JL, Hernández G. 2008. Essential role of MYB transcription factor: PvPHR1 and microRNA:PvmiR399 in phosphorus deficiency signaling in common bean roots. *Plant Cell. Environ.* 31:1834-1843
- Valverde A y Mariano JI 2011. El género frankia: el otro gran protagonista. En: Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos. Mejías MG, Rivilla RP, Soto MJ, Delgado MJ, González E, Mateos PF, León M, Rodelas B, Bedmar EJ (eds). Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN). pp:283-295.
- van Berkum P, Eardly BD. 2002. The Aquatic Budding Bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1132-1136.
- Vance CP. 2008. Carbon and nitrogen metabolism in legume nodules. In: Nitrogen leguminous symbiosis. Dil-Worth MJ, James EK, Sprent JI, Newton WE (eds). Springer, Dordrecht. pp:293-320.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev.* 60:407-438.
- Vandamme. P, Goris J, Chen WM, de Vos P, Willems A. 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov. nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25:507-512.
- VandenBosch KA, Bradley DJ, Knox JP, Perotto S, Butcher GW and Brewin NJ. 1989. Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *EMBO. J.* 8:335-342
- Vargas C, McEwan AG, Downie IA. 1993. Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. *Anal. Biochem.* 209:323-326.
- Versalovic JV, de Bruijn FJ, Lupski JR. 1998. Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. In: Bacterial genomes: physical structure and analysis. de Bruijn FJ, Lupski JR, Weinstock GM (eds). Chapman and Hall, New York, NY. pp:437-454.

- Vincent JM. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria IBP Handbook 15 Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Vinuesa P, Neumann-Silkow F, Pacios-Bras C, Spaink HP, Martínez-Romero E, Werner D. 2003. Genetic analysis of a pH-regulated operon from rhizobium tropici CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. Mol. Plant-Microb. Interact. 16:159-168.
- Wei H, Layzell DB. 2006. Adenylate-coupled ion movement. A mechanism for the control of nodule permeability to O₂ diffusion. Plant Physiol. 141:280-287.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Bacteriol. 173:697-703.
- Welsh DT. 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. FEMS. Microbiol. Rev. 24:263-290.
- Willems A. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant Soil. 287:3-14.
- White J, Prell J, James EK, Poole P. 2007. Nutrient Sharing between Symbionts. Plant Physiol. 144:604-614
- Witty J y Minchin F. 1990. Oxygen diffusion in the legume root nodule. En Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. Gresshoff PM, Roth LE, Stacey G, Newton WE (eds.). Chapman & Hall, New York. pp:285-292
- Woese C, Fox G. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 74:5088-90.
- Wong-Villarreal A, Caballero-Mellado J. 2010. Rapid identification of nitrogen-fixing and legume-nodulating *Burkholderia* species based on PCR-16S rRNA species-specific oligonucleotides. Syst. Appl. Microbiol. 33:35-43.
- Wood JM, Bremer E, Csonka LN, Kraemer R, Poolman B, van der Heide T, Smith LT. 2001. Osmosensing and osmoregulatory compatible solute accumulation by bacteria. Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol. 130:437-460.
- Wright SF Upadhyaya A, Buyer JS. 1998. Comparison of N-linked oligosaccharides of glomalin from arbuscular mycorrhizal fungi and soils by capillary electrophoresis. Soil. Biol. Biochem. 30:1853-1857.
- Zahran HH, Sprent JI. 1986. Effects of sodium chloride and polyethyleneglycol on root hair infection and nodulation of *Vicia faba* L plants by *Rhizobium leguminosarum*. Planta. 167:303-309.

- Zahran HH. 1999. *Rhizobium*-legumes symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*63:968-989.
- Zahran HH. 2009. Enhancement of rhizobia-legumes symbioses and nitrogen fixation for crops productivity improvement. In: *Microbial strategies for crop improvement*. Khan MS et al. (eds). Springer-Verlag. Berlin, Heiderbech.
- Zakhia F, de Lajudie P. 2006. Modern bacterial taxonomy: techniques review application to bacteria that nodulate leguminous plants (BNL). *Can. J. Microbiol.* 52:169-181.
- Zhou M, Tucker TC, Pessaraki M, Cepeda JA. 1992. Nitrogen fixation by alfalfa with two substrate nitrogen levels under sodium chloride stress. *Soil. Scien. Soc. Am. J.* 56:1500-1504.
- Zufferey R, Preisig O, Hennecke H and Thöny-Meyer L. 1996. Assembly and function of the cytochrome *cbb*₃ oxidase subunits in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 271:9114-9119.
- Zufferey R, Arslan E, Thöny-Meyer L, Hennecke H. 1998. How replacement of the 12 conserved histidines of subunit I affect assembly, cofactor binding, and enzymatic activity of the *Bradyrhizobium japonicum cbb*₃-type oxidase. *J. Biol. Chem.* 273:6452-6459.
- Zurayk R, Adian M, Baalbaki R, Saxena MC. 1998. Interactive Effects of Salinity and biological nitrogen fixation on Chickpea (*Cicer arietinum* L) Growth. *J. Agron. Crop. Sci.* 180:249-258.

8. ANEXO

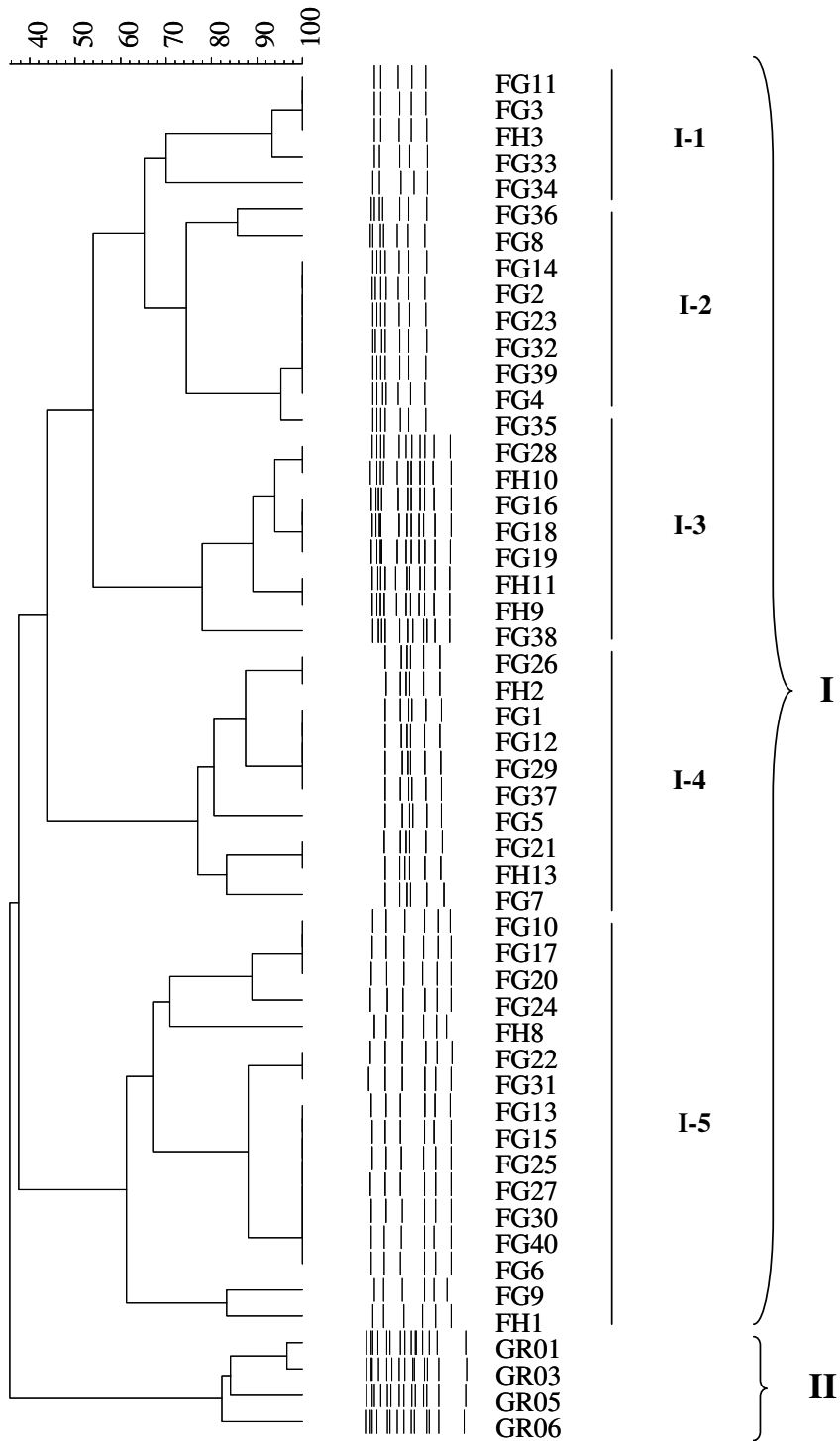


Figura 1S. Cladograma correspondiente a REP-PCR de las cepas aisladas de plantas de *P. vulgaris*.