



Academia de Ciencias Matemáticas,
Físico-Químicas y Naturales de Granada

**CUATRO DÉCADAS EN LA SIMBIOSIS
RHIZOBIUM-LEGUMINOSA**

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN
COMO ACADÉMICO NUMERARIO POR EL

ILMO. SR. D. JOSÉ OLIVARES PASCUAL

GRANADA, 2003



Academia de Ciencias Matemáticas,
Físico-Químicas y Naturales de Granada

**CUATRO DÉCADAS EN LA SIMBIOSIS
RHIZOBIUM-LEGUMINOSA**

DISCURSO LEÍDO EN EL ACTO DE SU RECEPCIÓN
COMO ACADÉMICO NUMERARIO POR EL

ILMO. SR. D. JOSÉ OLIVARES PASCUAL

GRANADA, 2003

CUATRO DÉCADAS
EN LA SIMBIOSIS
RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

CUATRO DÉCADAS EN LA SIMBIOSIS

RHIZOBIUM-LEGUMINOSA

JOSÉ OLIVARES PASCUAL

Es la segunda vez que me encuentro con el compromiso de justificar frente a una docta corporación como la presente, la anterior fue ante la Real Academia Nacional de Farmacia, el resultado de la elección realizada hace unos meses. Elección que pudo estar seguramente teñida de una cierta falta de ecuanimidad por la ceguera que impone el cariño y la estima, que es mutua, de los que me propusieron para ocupar un puesto en esta Academia con ya larga singladura en el quehacer por la defensa de la ciencia en el rico abanico de saberes de nuestra Universidad. A Manuel Rodríguez Gallego, Manolo, de cuya amistad he gozado desde casi nuestros primeros días de vida lo que me ha permitido conocer

todas sus buenas cualidades, a Alberto Ramos Cormenzana, primero como alumno y luego como compañero en mi Centro, la Estación Experimental del Zaidín, hasta que paso a la Universidad de Barcelona, y siempre como modelo en su capacidad de trabajo, entrega al mismo y entusiasmo por la tarea bien hecha, sin olvidar su ofrecimiento para contestar hoy este discurso, quiero agradecerles, así como a todos los que de una u otra manera han intervenido, el interés que han puesto en la defensa de mi candidatura.

A estas alturas de la vida me es difícil escoger un tema para agotar los minutos que el reglamento exige al electo para ser aceptado como académico de número. Y es difícil, porque ya se da uno cuenta de que darle vueltas a lo que por más de cuarenta años ha sido el objeto de su investigación, lo único que puede causar es cansancio y aburrimiento en la audiencia, porque si algo nos caracteriza a la mayoría de los científicos es nuestra incapacidad para transmitir los conocimientos con la suficiente altura científica y amenidad a los que no están directamente implicados en nuestra parcela de trabajo. Ya ha pasado el tiempo de la erudición, la ciencia

moderna ha constreñido cada vez más nuestro espacio de actuar y saber, hemos llegado a lo que don Luis Recalde, recordado miembro de esta Academia, solía decir con frecuencia: el especialista sabe todo de casi nada, o lo que Ortega llamaba “la barbarie del especialismo”. Nos hemos ido viendo abocados a circunscribir nuestra investigación de una forma tal que el fisiólogo olvida la bioquímica, el bioquímico la fisiología, el biólogo molecular se queda en la expresión del ADN sin importarle, la mayoría de las veces, si el ARN mensajero traducido va a ser o no una proteína funcional o requiere una modificación posterior para ser activa. Todos comprenderán que estoy exagerando, pero no es raro encontrarnos con este tipo de situaciones que se deberían evitar con la formación integrada del universitario y donde la Academia tiene mucho que decir como conjunto de personas con alta formación en las distintas ramas de la ciencia. Porque ésta, la ciencia, a la velocidad que avanza se nos escapa de las manos, como el azogue, decía Clarín, por entre las junturas de los dedos, y sólo va quedando un depósito lleno de recuerdos, nostalgia, tal vez, pero también de ilusión siempre viva.

Como farmacéutico, según la Pragmática de 1650 de Felipe IV, me puedo considerar científico y como tal debo exponer aquí algo sobre ciencia, pero, ¿de qué otra cosa puedo hablar yo, dado mi tiempo dedicado a ello, que no sea de la fijación de nitrógeno o, mejor, de esa íntima relación que se establece entre unas bacterias y las raíces de las habas, lentejas, judías, guisantes, etc. que a menudo nos encontramos en el plato, aunque quizá no con la frecuencia que sería de desear, no sólo porque es el mensaje que nos lanzan los nutriólogos, sino porque la provisión de proteína por su medio es económica y ecológicamente mucho más rentable que el filete de vaca con el que siempre tratamos de sustituirlas. En ésta época que estamos viviendo, con el reclamo continuo de la sostenibilidad en el desarrollo, el cultivo de estas plantas que al contrario que otras, tan importantes como el trigo, arroz o maíz, no requiere la utilización de fertilizantes nitrogenados para obtener unos rendimientos aceptables, es paradigma en el contexto de la agricultura sostenible. La inoculación de las semillas de estas plantas con estos microorganismos, en general conocidos como rizobios, castellización de *Rhizobium*, nombre del género único

que hasta hace unos años englobaba todas las especies conocidas capaces de establecerse en simbiosis fijadoras con leguminosas, es una práctica, una de las que integran la biofertilización, que mejora la productividad al mismo tiempo que respeta el ambiente. Ha sido utilizada desde 1888 cuando Hellriegel y Wilfarth descubrieron estas bacterias en las tumoraciones o nódulos que encontraron en las raíces de estas plantas, aunque ya el efecto beneficioso de las leguminosas se aprovechaba desde los romanos en la rotación de cultivos.

Me ha parecido oportuno tratar, más que exhaustivamente un aspecto concreto de esta simbiosis, hablar de algunos de los hitos que han jalonado la investigación sobre la fijación de nitrógeno, en general, y la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, en particular, con los que me he ido encontrando a lo largo de mi historia científica, y a los que a algunos hemos aportado una modesta contribución, desde mi arribo al Departamento de Microbiología de la Estación Experimental del Zaidín, de la mano de mi inolvidable maestro, Vicente Callao, y donde encontré a uno de los fundadores de esta Corporación, Enrique Montoya, al que desde entonces

me unió una gran amistad y del que durante los años de convivencia laboral aprendí no pocas cosas. Estas palabras que voy a pronunciar a continuación pueden servir además de un sentido homenaje a ellos, para dar un repaso al tema, aunque no con la profundidad que quisiera y sería menester dados los imperativos del tiempo que se me ha concedido.

El Premio Nobel Norman Borlaug dijo en su día que la fertilización química es el combustible que ha empujado la Revolución Verde a su éxito. Cuando hay agua suficiente el nitrógeno es el mayor factor limitante del crecimiento de las plantas. Aunque la fuente de nitrógeno sea inagotable, hay encima de nosotros algo así como 7 Tn de nitrógeno por m^2 , no es directamente aprovechable sin recurrir a la utilización de recursos no renovables, petróleo y gas, para su transformación en asimilable. El uso masivo de fertilizante que requieren los cultivos intensivos está determinando un deterioro ambiental que, junto a la falta de poder adquisitivo para los pequeños agricultores de los países en desarrollo, hace esencial el aprovechamiento de la fijación de nitrógeno. En una reciente revisión sobre aplicaciones de

la biotecnología para el incremento de la producción vegetal, la mejora de la fijación de nitrógeno aparece, junto con la obtención de plantas resistentes a insectos, enfermedades y a estreses abióticos, como una de las aproximaciones a tener en cuenta.

En los últimos 40 años, la producción mundial de alimentos per cápita ha crecido un 25 por ciento pero a pesar de eso todavía hay unos 800 millones de personas que se van a la cama con hambre. Está claro que ese incremento en la producción no ha contribuido proporcionalmente a eliminarla. Se dan otros condicionamientos de tipo social, político y económico que afectan al aprovechamiento por todos de esos recursos, aparentemente suficientes. Los hábitos alimenticios que priman el uso de la carne, mientras arrinconan las proteínas vegetales, contribuyen en gran manera a ese déficit alimenticio. Podemos tener la evidencia cierta de que los sistemas agrícolas pueden ser económica, ambiental y socialmente sostenibles. Se puede incrementar la productividad y minimizar el costo ambiental con el uso de una adecuada tecnología y prácticas agrícolas, entre las que el aprovechamiento de

la fijación de nitrógeno, como ya hemos dicho arriba, ocupa un lugar preminente (1), hoy día con su potencial reducido a las leguminosas, en un futuro, más o menos lejano, con la extensión de esta capacidad a otros cultivos tan importantes, como los cereales.

Hasta los primeros 60, mis pasos iniciales como investigador, los conocimientos sobre la fijación de nitrógeno habían avanzado poco y la investigación se limitaba a estudios puramente microbiológicos, fisiológicos y donde más adelantadas estaban las cosas era en los aspectos bioquímicos con la identificación de la enzima nitrogenasa (2) y demás factores y cofactores que intervienen en la reducción del nitrógeno a amonio, entre ellos, el molibdeno, cuya necesidad fue descrita a finales de los años 30 por Herman Bortels, bajo cuya dirección, cuando ya estaba para jubilarse, transcurrió mi estancia como becario en Berlín. A pesar de eso quedaban, y aún hoy quedan, muchos aspectos pendientes de su total aclaración. Aunque se conoce que el cofactor FeMo de la nitrogenasa es el lugar de unión de la enzima al sustrato, cómo se une y se activa se desconoce a la altura del 2003 a pesar de los denodados

esfuerzos de investigadores reconocidos, antes en Brighton y luego en el John Innes. En cambio, pronto se encontró que concomitante con la reducción del nitrógeno molecular a amonio había reducción de protones, esto es, la nitrogenasa repartía los electrones entre ambos sustratos en una relación aproximada de 3 a uno, respectivamente. En el caso de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa este hecho supone una pérdida de eficiencia en el consumo de energía que puede recuperarse si junto a la nitrogenasa la bacteria posee hidrogenasa capaz de reciclar el hidrógeno liberado (3). Son importantes en este campo las aportaciones, algunas de interés práctico (4), realizadas por el grupo del Prof. Ruiz Argüeso de la Universidad Politécnica de Madrid, con el que mantenemos estrecha relación.

La buena marcha de todos los estudios estaba, sin embargo, ralentizada por la carencia de un método fácil para poner de manifiesto la fijación, pues sólo se disponía de la observación de la capacidad de crecer las bacterias libres en medios sin nitrógeno, nada seguro, y de la poco accesible técnica del ^{15}N . La entrada en el escenario a mediados de los 60, de la mano de Koch y

Evans, de un método asequible y rápido, bastaba con un cromatógrafo de gases, basado en la propiedad de la nitrogenasa de reducir, además del nitrógeno, otros compuestos con triple enlace, como el acetileno, supuso un gran salto cuantitativo en la investigación. Su uso permitió no sólo conocer con seguridad la presencia de la capacidad fijadora en muchos procariotas, sino que fue el gran apoyo que requería el estudio de la genética y regulación de la fijación, pues con ella los mutantes obtenidos podían ser rápidamente identificados. Esta medida, de uso general hoy día, está haciendo crecer de modo continuo la lista de fijadores que se reparten por la mayor parte de los grupos de bacterias y algunas arqueobacterias. Se están encontrando especies muy interesantes para los estudios evolutivos y desde el punto de vista de su posible aplicación práctica.

La puesta de largo de la genética de la fijación coincide o, más bien se debe en gran parte, como ocurrió en otros campos de la biología, al descubrimiento de las enzimas de restricción y de toda la parafernalia ligada a lo que a mediados de los años 70 se conocía como tecnología del ADN recombinante. La aproximación

moderna a la genética de la fijación se inició realmente en 1971 por Streicher y colaboradores quienes transfirieron por transducción genes de la fijación entre cepas de *Klebsiella pneumoniae*. Experimentos que el grupo de John Postgate repitió usando la conjugación como medio de transferencia. No hay que olvidar una circunstancia crucial que facilitó el estudio genético, que esa bacteria, capaz de fijar nitrógeno en anaerobiosis, era muy cercana a *Escherichia coli* y tenía todos los genes esenciales para la fijación, que se llamaron *nif*, formando un supraoperón. Este hecho permitió pronto conocer que eran unos veinte los genes necesarios, que se distribuían en 9 operones, así como lo que codificaba cada uno, cuáles eran los genes estructurales, de cuáles dependía el transporte de electrones o aquellos que estaban implicados en la regulación. Como bien sabía la naturaleza que es, este proceso, altamente consumidor de energía, está sometido a una estricta regulación, de tal modo que sólo funciona, para no malgastar la energía disponible, en ausencia de oxígeno y de nitrógeno combinado directamente utilizable por la bacteria,. Ya, casi 20 años antes de aparecer la técnica de la PCR, se

encontró por hibridación que prácticamente los mismos genes estaban en todos los organismos fijadores, libres o simbióticos, variaba, eso sí, su distribución, que no era tan perfecta como en *Klebsiella* y, aunque había algunas diferencias propias de la singularidad de cada especie, era constante la presencia de los genes estructurales y unos sistemas de regulación, que más o menos sofisticados, recuerdan a los inicialmente descubiertos en aquella enterobacteria (5). No se piense que la cosa ha sido fácil, ahora, en este año 2003, se está todavía publicando sobre el mecanismo de regulación interno de los genes *nif*, *ntr*, etc. (6, 7)).

Estudios paralelos en otras bacterias libres como *Azotobacter*, *Clostridium*, cianobacterias, etc. fueron casi paralelos, sin embargo, en los endofitos obligados, como *Rhizobium*, su estudio genético tuvo que esperar a tener más conocimientos de su biología básica y de hecho, hasta finales de los 70 no aparecieron los primeros trabajos genéticos sobre esta bacteria relacionados con la fijación, aunque unos años antes ya se describieron mutantes auxotrofas y resistentes a antibióticos que permitieron realizar mapas genéticos y a

la construcción de los cuales contribuimos por aquel tiempo (8). La localización de los genes relacionados con la simbiosis tuvo que esperar pues la necesidad de la planta para poner de manifiesto la función codificada dificultaba su estudio. Luego llegó el hallazgo de la implicación de los plásmidos en la expresión de la fijación. La mayoría de las especies del género *Rhizobium* y de otros géneros afines llevan plásmidos de diferente tamaño y en número variable. En muchas especies los genes relacionados con la nodulación y fijación se localizan en estos elementos genéticos, algunos de los cuales, como los de *Sinorhizobium meliloti*, se pueden considerar como cromosomas a juzgar por su tamaño, más de 1,5 Mbases. Unos plásmidos son crípticos, sin función conocida, y otros llevan, como es usual en este tipo de elementos, genes que codifican caracteres dispensables y que circunstancialmente pueden favorecer el crecimiento de la bacteria en condiciones desfavorables o beneficiar su desarrollo en otras. En el 2º Congreso Internacional sobre Fijación de Nitrógeno, celebrado en 1976 en Salamanca fuimos los primeros en dar cuenta de la

presencia de estos elementos genéticos en *Rhizobium* (9). Una característica interesante y frecuente en ellos es su movilidad, permitiendo el trasiego, valga la palabra, de información genética de unas bacterias a otras y, por tanto, de la extensión de determinadas características como puede deducirse de los estudios de evolución y biodiversidad en curso. De hecho, en la mayoría de los casos su contenido en G+C difiere del de la célula hospedadora, lo que demuestra su origen foráneo. Esta misma diferencia en bases se observa en las islas simbióticas, regiones de ADN más o menos largas que albergan los genes relacionados con el establecimiento de la asociación, y equiparables, en parte, a las conocidas como islas de patogenicidad en las correspondientes bacterias perjudiciales para el hombre o animales.

En los primeros 80 se obtuvieron mutantes de *Rhizobium* incapaces de nodular que recuperaban el carácter por complementación (10). Comenzaba así el análisis molecular del proceso de infección, capitaneado, en principio, por los grupos de Ausubel, Rolfe y Kondorosi, y que con el tiempo describieron la existencia de numerosos genes *nod*, su función, su regulación y su

localización, en muchos casos, como se ha dicho antes, en plásmidos de diferente tamaño. Dada la dificultad de estas bacterias para transformarse, resuelta en parte hoy con la electroporación, hubo que usar la conjugación y gracias al empleo de transposones, principalmente Tn5, se pudieron conseguir mutaciones puntuales lo que facilitó el estudio de todo este conjunto de genes que bien pronto se localizó en *R. meliloti*, hoy *Sinorhizobium meliloti*, a unas 30 kilobases de los genes estructurales de la nitrogenasa (11). Se conoció que en ese conjunto de genes había unos que podían llamarse comunes, muy parecidos en todas las especies, e incluso intercambiables, y otros específicos, y que algunos de ellos tenían un papel director o regulador, como el gen *nodD* (12). Pero qué codificaban esos genes *nod* y qué los inducía, permanecía todavía oscuro. En 1986, los grupos de Barry Rolfe y Sharon Long describen que las flavonas inducen la expresión de los genes *nod* (13). Estos compuestos, de naturaleza fenólica, son exudados por las raíces de las plantas. Es apasionante la historia de la identificación de más de la treintena de genes que están implicados en la nodulación. Desde la modificación

de los pelos radicales hasta la aparición del nódulo, pasando por la curvatura del pelo, la formación del canal de infección que llevará las bacterias al interior de las células, la división celular junto al periciclo, etc., es la respuesta de la planta a la señal producida por *Rhizobium* y que hasta 1990 no se deja conocer (14). Era lo que se conoce como Factor nod. Se llamó la molécula del año en el congreso Internacional de Fijación de Nitrógeno celebrado en Knoxville, Tennessee USA, y fue encontrada por el grupo de Jean Denarié en Toulouse. La señal que faltaba en la comunicación microbio-planta. En estas dos señales, dos moléculas, la de origen vegetal y la bacteriana, estriba la especificidad que desde los primeros tiempos se había observado en la asociación *Rhizobium*-leguminosa, por la que alfalfa, por ejemplo, sólo es nodulada por *S. meliloti*, soja por *Bradyrhizobium japonicum*, y trébol por *R. leguminosarum* bv. trifolii, y en la que se basaba, hasta hace unos años, la clasificación en especies de estas bacterias, dentro todas del género *Rhizobium*, a lo que volveremos más tarde.

Antes del conocimiento de estas señales, se consideraban elementos importantes en el

reconocimiento mutuo las lectinas de las plantas, por un lado, y los polisacáridos bacterianos, por el otro. De hecho, el papel de estos últimos, si bien no es determinante de la especificidad y por sí solos no son capaces de poner en funcionamiento el proceso de infección, sí tienen mucho que ver en la buena marcha de la interacción simbiótica. Nosotros describimos hace bastantes años, por una técnica nueva diseñada para conocer el grado de infectividad de cepas de *Rhizobium*, la implicación de los polisacáridos extracelulares en el establecimiento de la asociación (15).

La estructura química básica del factor o factores nod es complicada pero con gran semejanza entre los producidos por las distintas especies. Se trata de una cadena común (de 3 a 5 eslabones) de N-acetil glucosamina (quitina), derivada de la expresión de los genes llamados comunes, con una sustitución en el extremo no reductor de una cadena alifática de variada longitud e insaturación y distintas sustituciones en el extremo reductor. Estas decoraciones del esqueleto son las que determinan la especificidad y su síntesis está determinada por los genes *nod* llamados específicos,

todos ellos inducidos por el gen *nodD*, sensor del flavonoide adecuado. Por su naturaleza, también se conoce a los factores nod, como lipoquitooligosacáridos o LCO. Cuando *Rhizobium* esta próximo a la raíz, atraído a ella quimiotácticamente, comienza entre planta y bacteria una conversación, que algunos han llamado inteligente, por la que el microsimbionte capta la señal emitida por la planta, biosintetiza su señal, factor nod, que induce en la raíz las transformaciones adecuadas para llegar a formar el nódulo, órgano en cuyo interior, bien organizado, se va a llevar a cabo la reducción del nitrógeno molecular a amonio que va a ser, a su vez, asimilado por la planta. La evolución de la nodulación ha sido bien explicada en algunas revisiones recientes, como la de Gualtieri y Bisseling (16). La energía necesaria para llevar a cabo la fijación es proporcionada por el fotosintetizado que llega al nódulo procedente de las hojas. Por este estado simbiótico, la planta proporciona alimento a la bacteria mientras que ésta le da el nitrógeno que necesita. Sin embargo, tal vez no se podría hablar de una auténtica simbiosis si tenemos en cuenta que *Rhizobium* fijador en el nódulo, en la forma de

bacteroide, está en fase terminal, no se multiplica y al final desaparece. Recientemente se ha visto que en la base de los nódulos ya senescentes queda una población de bacterias indiferenciadas que viven a costa de los lisados celulares y que son las que van a permitir la supervivencia de la especie (17). El pasado septiembre (18), la revista Nature publicó un artículo donde se describe que la leguminosa discrimina las cepas de *Rhizobium* incapaces de fijar nitrógeno. Esto contribuye a la selección natural de las mejores y es la explicación experimental al modelo teórico publicado por Jiménez y Casadesús en 1989 (19)

En el camino de los conocimientos que va desde que el factor nod es reconocido hasta que se forma el nódulo hay muchas lagunas. Poco se sabe del receptor en la célula vegetal y la transducción de la señal captada. Sólo que de 1 a 2 minutos después de la adición de dicho factor a la raíz ocurre una despolarización de la membrana de los pelos radicales causada por una rápida entrada de calcio al citosol y la correspondiente salida de iones cloruro, la salida posterior de potasio restablece la membrana a su polaridad normal. Esta situación continúa

por un tiempo que se manifiesta en pulsos sucesivos de subida y bajada del calcio citosólico. Se duda todavía de la implicación en la cascada de activación de proteínas G aunque sí parece que el factor nod causa un incremento en la concentración de ácido fosfatídico y otros fosfolípidos que a su vez parecen inducir la expresión de alguna de las nodulinas conocidas, como la ENOD12.

Pero, ¿cuál podría ser el receptor de los factores nod? Precisamente las oscilaciones de calcio inducidas por ellos (20) se han convertido en clave para el análisis de mutantes del hospedador en genes implicados en la percepción y transducción de la señal. Es de tener en cuenta que muchos de estos genes participan también en el proceso de reconocimiento e infección de las plantas por los hongos de la micorriza. El estudio de tales mutantes ha determinado la detección de genes ortólogos en varias especies de leguminosas. Un locus clonado codifica, de acuerdo con lo publicado el año pasado en la prestigiosa revista Nature (21), una quinasa rica en repeticiones de leucina en un dominio aparentemente extracelular. La función de esta quinasa receptora putativa está por demostrar y puede formar

parte de un complejo grande con otros componentes que determinan la especificidad de los factores nod. Los motivos ricos en repeticiones de leucina tienen una función general en el reconocimiento de proteínas lo que sugiere que estas quinastas están implicadas sólo indirectamente en el reconocimiento de los factores del tipo de los nod. Parece necesaria una señal intermedia que haga de puente entre el factor nod y los receptores ricos en leucina. Como ejemplo de lo que decíamos arriba, estos receptores son comunes tanto para la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa como para las micorrizas arbusculares.

En junio pasado (22) se describió el primer mutante de *Medicago truncatula* que no responde al Factor nod con la deformación de los pelos radicales ni flujo de calcio. Este mutante (*npf*) es capaz, sin embargo, de establecer simbiosis con hongos de la micorriza, por lo que el locus NPF (Nod Factor Perception), así se le conoce, está implicado de forma específica en la percepción del Factor nod, al contrario que otros descritos previamente comunes a ambas simbiosis (DMI1, DMI2, DMI3). ¿Estamos ya a las puertas de

conocer el receptor al que tanto tiempo y esfuerzo se ha dedicado?

En los 80, se comienza por Verma (23), a conocer a nivel molecular el fruto causado por esa señal con la descripción de proteínas que aparecían en las raíces de las leguminosas en respuesta a la interacción con *Rhizobium*, detectadas, bien por el estudio comparado de los correspondientes proteinogramas, en los primeros estudios, o, más recientemente, de los ARNm aislados entre plantas inoculadas y testigo. Se pudo establecer la distinción entre nodulinas, así se llamó a estas proteínas, tempranas y tardías, según se detectaran en los primeros estadios de la interacción o más tarde. Las ya tan conocidas leghemoglobinas, que permiten la buena oxigenación del bacteroide en un nicho con baja pO_2 fueron las primeras en ser introducidas en este saco. La situación es tan complicada que aún hoy, casi veinte años después, siguen apareciendo nodulinas nuevas y muchas de ellas sin función conocida. Y en línea con lo que antes comentábamos, se han encontrado algunas nodulinas comunes a las dos simbiosis mutualistas, las simbiosinas,

mientras que las propias de las micorrizas se conocen como micorrizinas. Hemos mencionado más de una vez las micorrizas sin aclarar lo que son. Se trata de una asociación endorrízica mutualista hongo-planta (24), que se da en casi todas las especies vegetales y favorece su nutrición ya que las hifas del hongo en el exterior de la raíz actúan como prolongación de la misma lo que lleva a un mayor volumen de suelo explorado. Por el otro extremo se asientan en el interior de las células corticales formando arbuscúlos en íntimo contacto con su citosol lo que permite el intercambio de nutrientes. Con alguno de ellos, como el fósforo, su presencia es bien patente pues el ión fosfato, poco móvil en el suelo, se desplaza rápidamente a través de las hifas y, algo que también hay que señalar en ese paralelismo entre fijación simbiótica y micorrización, es la inhibición de su establecimiento por la presencia en el medio de nitrógeno combinado o fósforo asimilable, respectivamente.

En otro orden de cosas y con el ánimo de ser un poco globalizador en el asunto de la fijación, tenemos que retrotraernos unas décadas atrás y así nos encontramos con la expectación que causó la asociación

que describió la incansable Johanna Döbereiner en 1972. Ese año comienza a publicar sus estudios realizados en Brasil sobre las asociaciones fijadoras, o ricensis diazotróficas, como la formada entre *Paspalum notatum* y *Azotobacter paspali* y un par de años más tarde la establecida entre *Spirillum lipoferum*, hoy *Azospirillum*, y algunas gramíneas. Su entusiasmo desbordante la llevó a considerar estas últimas bacterias fijadoras como la solución al problema de la fertilización nitrogenada puesto que eran capaces de asociarse con plantas tan importantes como el maíz o la caña de azúcar (ver 25). Como ocurre con otras asociaciones, aparentemente fijadoras descritas más tarde, que implican *Herbaspirillum*, *Gluconacetobacter* o *Azoarcus*, hay muchas voces críticas que dudan que la causa del efecto beneficioso encontrado cuando estos organismos interactúan con la planta sea la capacidad fijadora de nitrógeno que la bacteria muestra en vida libre. Algunos autores, entre ellos nuestro buen amigo Jakov Okon, de la Universidad Hebrea de Jerusalén, estiman que, entre otras cosas, la producción de fitohormonas por estas bacterias y el gran aprovechamiento que la planta hace de

ellas por su crecimiento endocortical es la causa del mayor desarrollo de las plantas colonizadas (26).

Aunque la primera información sobre nódulos en el tallo de algunas leguminosas, como *Sesbania* o *Aesquynomene*, que crecen en suelos encharcados, data de 1929, hasta 1983 no se hace más extensivo su estudio con la aplicación a este sistema de la metodología que había permitido el desarrollo científico habido en las asociaciones más conocidas que implicaban la alfalfa, el trébol o el guisante. Tanto los nódulos de la raíz como los del tallo eran producidos por bacterias que se encuadraron en el género *Azorhizobium*. La proximidad física de la fijación y la fotosíntesis confería interés a esta particular simbiosis por lo que supone la cercanía entre la fuente de energía y el lugar de consumo. Pero, además, se han aislado bacterias de nódulos de *A. indica*, *sensitiva* o *aspera* y de la rizosfera de otras plantas que exhiben una característica inusual en otras especies de *Rhizobium*, la fotosíntesis (27). Por ello la iluminación de los nódulos del tallo determina una reducción de acetileno acelerada como corresponde a la actividad fotoquímica presente en el microsimbionte.

Hay que tener en cuenta que el fotosintetizado en forma de ácidos dicarboxílicos, es la fuente de energía, poder reductor y esqueleto carbonado para la incorporación del amonio formado, aunque hace muy poco (28) se ha conocido la necesidad de la entrada de glutamato en el bacteroide para que la planta pueda aprovechar el nitrógeno fijado. Parece que estas bacterias fotosintéticas del género *Azorhizobium* hay que considerarlas como una subrama separada de *Bradyrhizobium* de acuerdo con su ARN ribosómico.

Precisamente del estudio comparado del 16S ARN ribosómico, hoy en contestación cuando se ha constatado la alta frecuencia de transferencia horizontal, y de la utilización de otros criterios moleculares, la sencilla clasificación taxonómica de *Rhizobium* imperante desde 1903, esto es, la distribución de las especies en un sólo género, *Rhizobium*, de acuerdo con la leguminosa o grupo de leguminosas con las que interaccionaba, se ha pasado poco a poco a la colocación de las diferentes especies en varios géneros e, incluso, como se puede ver en la última clasificación de Bergey, en distintas familias. Así, lo que se considera en general

como *Rhizobium* engloba ahora las especies de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium*... y, puntos suspensivos, pues posiblemente mañana habrá otro género más que añadir a la lista. Bien es verdad que existen plantas, como *Vigna* o *Phaseolus*, capaces de nodular con la mitad de *Rhizobium* conocidos y bacterias, como *Rhizobium* NGR234 que nodula casi la mitad de especies de leguminosas. En un reciente artículo en el Journal of Bacteriology, Billy Broughton (29) critica este cierto abuso de la taxonomía como ya lo indica en el mismo título del trabajo: Rosas por otros nombres.

Los estudios moleculares dieron pie a los correspondientes filogenéticos y evolutivos. La taxonomía ha pasado por sus etapas morfológica, fisiológica y hoy genómica y es curioso que los conocimientos acumulados, entre ellos la posibilidad de la comparación entre genomas, hayan confirmado lo que bastante empíricamente se venía estableciendo en la clasificación bacteriana. *Rhizobium* y *Agrobacterium* se emparentaron pronto por su relación, una beneficiosa y otra perjudicial, con las plantas. Luego se vio que estos

microorganismos llevaban plásmidos con igual mecanismo de replicación y donde, al menos en parte, se localizaban los genes de la interacción. Más tarde se sabe que la mayoría de las bacterias ya sean patógenas o mutualistas de plantas o animales llevan los genes que determinan este carácter más o menos agrupados en las ya mencionadas islas de patogenicidad o simbióticas, y aquellas que pasan parte de su ciclo de vida como parásitos intracelulares, comparten genes comunes que le permiten mantenerse en estas particulares condiciones ya sea en células animales o de plantas. *Brucella*, *Bartonella*, *Shigella* y *Rhizobium* son más parientes de lo que se piensa, nivel de parentesco que se extiende a casi todas las α proteobacterias (30). Basados en la similitud genómica y funcional entre *B. suis* y organismos tales como *Agrobacterium* y *Rhizobium*, hace posible que el ancestro de *Brucella* fuera una bacteria del suelo asociado a plantas.

Y hablando de patogénesis, es difícil establecer una línea bien definida entre esta y la simbiosis mutualista. Aunque cada uno de estos conceptos está bien claro, su expresión es a veces no nítida o se pasa

fácilmente de una a otra (31). De hecho, *Rhizobium* parece estar siempre a la defensiva frente al estrés biótico y abiótico que supone la interacción con la planta (32, 33). En principio, en la interacción microbio-planta ocurre como en los animales, que reaccionan frente a los agentes biológicos externos disparándose una respuesta inmune una vez que los microorganismos han traspasado las correspondientes barreras. Las plantas, para no ser menos, desarrollan también una respuesta, que se conoce como respuesta defensiva, que permite su supervivencia cuando es atacada por un organismo capaz de lesionarla más o menos gravemente. Dentro de esos organismos se encuadran los hongos, bacterias y virus así como los insectos y nematodos, que inducen en la planta, por mecanismos semejantes en todos los casos, un estado de resistencia, que lo mismo que en los animales puede ser sistémico y duradero (34). Sorprende que la leguminosa se deje engañar por *Rhizobium* para que se establezca el estado simbiótico sin que se dispare la respuesta defensiva. Esto es, que pueda reconocer la bacteria como no perjudicial y se ponga en marcha todo el mecanismo preparado para acoger a un visitante tan ilustre. La planta

tiene que reconocer la bacteria como algo no extraño o la bacteria tiene que camuflarse para pasar desapercibida. Este es el quid de la cuestión. ¿Que es lo que pasa? Todo hace pensar, de acuerdo con los indicadores, que muy al principio hay una respuesta defensiva, pero enseguida, tal vez debido a los factores nod, la respuesta se controla y la infección sigue adelante. El problema puede surgir cuando las plantas transgénicas resistentes a enfermedades se hayan hecho también resistentes, en el caso de las leguminosas, a la infección por *Rhizobium*. Dilucidar los mecanismos implicados que puedan confluir es un reto a la vista en el que estamos implicados. Al final de los 90 (35) describimos la acumulación de ácido salicílico en las raíces de alfalfa inoculadas con cepas incapaces de nodular, mientras que los niveles de esta molécula señal o mensajera en la respuesta defensiva eran muy bajos en la interacción compatible. Después vimos el control de las especies reactivas de oxígeno en la interacción compatible (36)

Las células bacterianas detectan la densidad de su población mediante un sofisticado sistema de comunicación célula a célula. Es lo que se conoce como

“quorum sensing” (ver 37) y regula variados conjuntos de diversas actividades fisiológicas. Estos procesos incluyen virulencia, competencia, producción de antibióticos, movilidad, simbiosis, como en el caso de la asociación *Rhizobium*-leguminosa, etc. Se puede considerar que quorum sensing es el primer eslabón de la cadena que va desde el organismo unicelular al pluricelular, que hace, como en el caso de las biopelículas, que todas las células bacterianas funcionen como un todo, de ahí la importancia de conocer íntimamente este proceso por las repercusiones que puede tener en numerosos ámbitos, uno de ellos, la mencionada simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, donde se ha visto que quorum sensing es de vital importancia. La eliminación en la bacteria de la capacidad de producir la correspondiente señal, un compuesto químico derivado de la acil homoserin lactona, repercute en el establecimiento de la asociación. Las plantas transgénicas dotadas del carácter de destruir o mimetizar la señal, afectan la simbiosis en el mismo sentido (38). Relacionado, hasta cierto punto con esto, nosotros hemos encontrado (39) que el movimiento controlado de las

células de *Rhizobium*, que se conoce como swarming, sobre la superficie de la raíz también afecta la simbiosis, posiblemente, y es pura especulación todavía, porque tal comportamiento actúa sobre el débil equilibrio que existe entre simbiosis y patogénesis.

No quisiera terminar estas leves pinceladas sobre el desarrollo de un tema de investigación a lo largo de los últimos 40 años, sin mencionar la vertiente práctica de la fijación de nitrógeno y dejar, por tanto, todo lo expuesto en un mero conjunto de conocimientos básicos, aunque es bien sabida, de todos o casi todos, mi particular lucha contra el economicismo de o en la ciencia, que se puede observar a todos los niveles, con el resultado de dejar abandonadas parcelas de interés potencial pero de poca rentabilidad actual. En este contexto, además, habría que tener siempre presente en nuestra investigación los dos puntos fundamentales a los que se refería hace años Noëlle Lenoir (40) al hablar del desarrollo de la ciencia: la preservación de la libertad de creación científica y la solidaridad intelectual y moral que permita que ese desarrollo beneficie a toda la humanidad.

Aunque a nivel global se puede considerar que cerca de la mitad del nitrógeno incorporado por las plantas cultivadas proviene de la fijación biológica, donde este proceso cobra mayor interés aplicado es en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, pues no en vano el nitrógeno fijado por estas plantas supone la mitad de un total de 125 millones de toneladas año, y eso a pesar de estar reducida su expresión a esta sola familia. Que hablemos de una sola familia no quiere decir que no sea importante. Es la tercera en número de especies (18.500) después de las compuestas y orchidiáceas, y la segunda, después de las gramíneas, en la alimentación humana. Por otra parte, tanto microsimbionte como hospedador, pueden ser manipulados genéticamente para poder aprovechar al máximo todas sus posibilidades. Sin embargo, todos los conocimientos sobre la fijación, sea libre o simbiótica, son aprovechables para conseguir en el futuro, y no es ciencia ficción, que cultivos tan importantes como el trigo, el arroz y el maíz, fuentes de alimento de las culturas occidental, oriental y americana, respectivamente, sean capaces de fijar nitrógeno, por sí mismos o como lo hacen las leguminosas, en asociación

con bacterias, con el consiguiente ahorro en consumo energético y en deterioro ambiental. Ha habido algunos tímidos intentos realizados por Cocking en arroz y colza inoculando con *Rhizobium* junto con enzimas líticas de la pared celular (41). Se obtuvieron pseudonódulos poco funcionales. La nodulación desde el reconocimiento mutuo hasta la propia formación del nódulo es un proceso regulado genéticamente por la planta y entre los numerosos genes implicados hay algunos, en paralelo con lo ya mencionado arriba, comunes con la formación de micorrizas, de tal forma que hay una buena colección de mutantes llamadas *Myc⁻* que también son nodulación deficientes. Lo que indica procesos paralelos con algo de singularidad. Recientemente se han encontrado en *Arabidopsis* (planta que ha permitido el considerable conocimiento molecular alcanzado, pero que desgraciadamente ni nodula ni micorriza) genes que se expresan en tallo y hojas que manifiestan su efecto a corta distancia sobre el crecimiento apical del tallo, mientras que sus ortólogos en leguminosas muestran su acción a larga distancia, sobre la formación de primordios y raíces laterales. Hay también similitud entre

los procesos de floración y nodulación incluso entre el desarrollo del canal de infección, por el que las bacterias llegan al interior de las células corticales y el del tubo polínico en su avance hacia el óvulo. Se puede decir que la nodulación ha utilizado mecanismos preexistentes en las plantas que han derivado a la simbiosis a lo largo de la evolución (42).

A pesar de la información científica acumulada, para llegar a algo concreto, no sólo es necesario salvar obstáculos técnicos, parece que los más fáciles, sino sociales, más arduos, pero la llegada de estos sistemas fijadores a lugares con pocos recursos facilitará su desarrollo. Se ha dicho, quizá con demasiado optimismo, que los cultivos transgénicos salvarán al mundo del hambre (43). Pero el verdadero impacto real de la tecnología ha sido hasta ahora el incremento de los rendimientos en los países ricos, lo que hace disminuir los precios y hundir más si cabe, la agricultura de los más pobres, y eso sin hablar de la agricultura subvencionada. Si no se ha terminado ya el hambre con el mejor reparto de los recursos suficientes que hay hoy, es difícil pensar que si entra en juego, además de la economía la

ecología, la mayoría de las veces pseudoecología o paraecología, el problema se va a solucionar. La mala disposición, por ejemplo, de países del sur de África a aceptar donaciones de maíz modificado genéticamente cuando tan lejos están del lugar de origen de estas plantas, es extraña e irresponsable. Es de esperar que mientras se obtienen transgénicas que resuman en sí mismas todo el trabajo realizado y por hacer sobre la fijación de nitrógeno y puedan ser de utilidad para los más desfavorecidos, se salven todos los obstáculos que impidan su aprovechamiento. Nosotros, que vivimos en el mundo desarrollado entre genómica, proteómica, metabolómica, la mayoría de los estudios dirigidos hacia la biomedicina, nos preocupamos si vamos a morir de cáncer o del corazón, pero estamos ciertos que no de hambre. Nos podemos permitir ese lujo, a pesar de dedicar sólo el 5 por ciento del suelo cultivable a las leguminosas, gracias a la producción y utilización masiva de fertilizantes baratos. No ocurre lo mismo en los países en desarrollo, donde la mayoría de las proteínas son de origen vegetal.

En este contexto tenemos que denunciar que los fondos para investigación en fijación biológica de nitrógeno son bajos y no está dentro de las previsiones de las distintas agencias incrementarlos. Sin embargo, estas especiales circunstancias no deben de disminuir nuestro entusiasmo por incrementar los conocimientos en este campo y hacer lo necesario para poner en práctica, sin prisas pero sin pausas, los resultados obtenidos. Pero, como dice Machado, nuestras horas son minutos/ cuando esperamos saber/ y siglos cuando sabemos/ lo que se puede aprender.

No quiero terminar sin repetir mi agradecimiento a los proponentes, agradecer también a los asistentes de cuya benevolencia he abusado con esta exposición, y no puedo olvidar decir que para llegar hasta aquí he necesitado de la ayuda de mi familia, mis maestros, mis discípulos, hoy compañeros, y de todos los que de una u otra manera han preparado el camino, estimulado y apoyado en mi vida científica.

He dicho

BIBLIOGRAFÍA

1. BAREA, J.M., OLIVARES, J. 1998. Manejo de las propiedades biológicas del suelo. En: Agricultura sostenible. Jiménez Díaz, R.M., Lamo de Espinosa, J. (eds), pp. 173-193. Mundi prensa. Madrid.
2. PETERS, J.W., FISHER, K., DEAN, D.R. 1995. Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 335-366.
3. EVANS, H.J., HARKER, A.R., PAPEN, H., RUSSELL, S.A., HAMUS, F.J., ZUBER, M. 1987. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 335-362.
4. BASCONES, E., IMPERIAL, J., RUIZ-ARGÜESO, T., PALACIOS, J.M. 2000. Generation of new hydrogen-recycling Rhizobiaceae strains by introduction of a novel *hup* minitransposon. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4292-4299.
5. ROBERTS, G.P., BRILL, W.J. 1981. Genetics and regulation of nitrogen fixation. *Annu. Rev. Microbiol.* 35, 207-235.
6. STUDHOLME, D.J., DIXON, R. 2003. Domain architectures of sigma 54 dependant transcriptional activators. *J. Bacteriol.* 185, 1757-1767.
7. MARTÍNEZ-ARGUDO, I., SALINAS, P., MALDONADO, R., CONTRERAS, A. 2002. Domain interaction of the *ntr* signal transduction pathway: two hybrid analysis of mutant and truncated derivatives of histidine kinase NtrB. *J. Bacteriol.* 184, 200-206.
8. CASADESÚS, J., OLIVARES, J. 1979. Rough and fine linkage mapping of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Mol. Gen. Genet.* 174, 203-209.
9. OLIVARES, J., MONTOYA, E., PALOMARES, A.J. 1977. Some effects derived from the presence of extrachromosomal DNA in *Rhizobium meliloti*. En: Recent developments of nitrogen fixation. Newton, W.E., Postgate, J.R., Rodríguez-Barrueco, C. (eds.) pp. 375-385. Academic Press, NY.
10. LONG, S.R., BUIKEMA, W.G., AUSUBEL, F.M. 1982. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of nod-mutants. *Nature* 298, 485-488.
11. KONDOROSI E., BANFALVI, Z., KONDOROSI, A. 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* 193, 445-452.
12. ROSSEN, L., SHEARMAN, C.A., JOHNSTON, A.W.B., DOWNIE, J.A. 1985. The *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* is autoregulatory and in the presence of plant exudates induces the *nodA*, *B*, *C* genes. *EMBO J.* 4, 3369-3373.
13. PETERS, N.K., FROST, J.W., LONG, S.R. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science* 233, 977-980.
14. LEROUGE, P., ROCHE, P., FAUCHER, C., MAILLER, F., TRUCHET, G., PROMÉ, J.C., DENARIE, J. 1990. Symbiotic host-specificity *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* 344, 781-784.

15. OLIVARES, J., BEDMAR, E.J., MARTÍNEZ-MOLINA, E. 1984. Infectivity of *Rhizobium meliloti* as affected by extracellular polysaccharides. J. Appl. Bacteriol. 56, 389-393.
16. GUALTIERI, G., BISSELING, T. 2000. The evolution of nodulation. Plant Mol. Biol. 42, 181-194
17. TIMMERS, A.C.J., SOUPENE, E., AURIAC, M.C., DE BILLY, F., VASSE, J., BOISTARD, P., TROUCHET, G. 2000. Saprophytic intracellular rhizobia in alfalfa nodules. Mol. Plant-Microbe Interact. 13, 1204-1213.
18. KIERS, E.T., ROUSSEAU, R.A., WEST, S.A., DENISON, R.F. 2003. Host sanctions and the legume-*Rhizobium* mutualism. Nature 425, 78-81.
19. JIMÉNEZ, J., CASADESÚS, J. 1989. An altruistic model of the *Rhizobium* legume association. J. Hered. 80, 335-337.
20. EHRHARDT, D.W., WAIS, R., LONG, S.R. 2000. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals. Cell 85, 673-681.
21. ENDRE, G., KERESTZ, A. KEVEL, Z., MIHACEA, S., KALO, P., KISS, G. 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. Nature 417, 962-966.
22. AMOR, B.B., SHAW, S.L., OLDROYD, G.E.D., MAILLET, F., PENMETS, R.V., COOK, D., LONG, S.R., DENARIÉ, J., GOUGH, C. 2003. The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. Plant J. 34, 495-506.
23. FULLER, F., VERMA, D.P.S. 1984. Appearance and accumulation of nodulin mRNAs and their relationships to the effectiveness of root nodules. Plant Mol. Biol. 3, 21-28
24. AZCÓN-AGUILAR, C., BAREA, J.M. 1980. Micorrizas. Inv. Ciencia 47, 8-16.
25. PEDROSA, F.O. 1988. Physiology, biochemistry, and genetics of *Azospirillum* and other root-associated nitrogen fixing bacteria. Crit. Rev. Plant Sci. 6, 345-384.
26. DOBBELAERE, S., VANDERLEYDEN, J., OKON, Y. 2003. Plant growth promoting effect of diazotrophs in the rhizosphere. Crit. Rev. Plant Sci. 22, 104-149.
27. MOLOUBA, F., LORQUIN, J., WILLEMS, A., HOSTE, B., GIRAUD, E., DREYFUS, B., GILLIS, M., DELAJUDIE, P., MASSON VOIVIN, P. 1999. Photosynthetic bradyrhizobia nodulate species and form a separate 16S ribosomal DNA restriction fragment length polymorphism group. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3084-3094.
28. LODWIG, E.M., HOSIE, A.H.F., BORDES, A., FINDLAY, K., ALLAWAY, D., KANNAKARAN, R., DOWNIE, J.A., POOLE, P.S. 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. Nature 422, 722-726.
29. BROUGHTON, W. 2003. Roses by other names. Taxonomy of the Rhizobiaceae. J. Bacteriol. 185, 2975-2979.
30. PAULSEN, I.T. et al. 2002. The *Brucella suis* genome reveals fundamental similarities between

- animal and plant pathogens and symbionts. Proc. Nat. Acad. Sci. US 99, 13148-13153.
31. BARON, C., ZAMBRISKI, P.C. 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding. Variations of a common theme. Annu. Rev. Genet. 25, 107-129.
 32. NOGALES, J., CAMPOS, R., BENABBDELKHALEK, 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-Microbe Interact. 15, 225-232.
 33. SANJUAN, J., NOGALES, J., SANJUAN-PINILLA, J.M., MUÑOZ, S., HERRERA-CERVERA, J.A., SOTO, M.J., LLUCH, C., OLIVARES, J. 2002. Desarrollo de simbiosomas en nódulos de leguminosas: Fijación de nitrógeno en un ambiente... ideal? En: Avances en el metabolismo de nitrógeno: de la biología molecular a la agronomía. Aparicio-Tejo, P. (ed), pp 325-331. Universidad Pública de Navarra.
 34. TAYLOR, C.B. 1998. Defense responses in plants and animals. More of the same. Plant Cell 10, 873-876.
 35. MARTÍNEZ-ABARCA, F., HERRERA-CERVERA, J.A., BUENO, P., SANJUAN, J., BISSELING, T., OLIVARES, J. 1998. Involvement of salicylic acid in the establishment of the *Rhizobium*-alfalfa symbiosis. Mol. Plant-Microbe Interact. 11, 153-155.
 36. BUENO, P., SOTO, M.J., RODRÍGUEZ-ROSALES, M.P., SANJUAN, J., OLIVARES, J., DONAIRE, J.P. 2001. Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H₂O₂ accumulation during the early stages of *Rhizobium*-legume symbiosis. New Phytol. 152, 91-96.
 37. MILLER, M.B., NASSIER, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 55, 165-199.
 38. ZHANG, L.H. 2003. Quorum quenching and proactive host defense. Trends in Plant Sci. 8, 238-244.
 39. SOTO, M.J., FERNÁNDEZ-PASCUAL, M., SANJUAN, J., OLIVARES, J. 2002. A *fadD* mutant of *Sinorhizobium meliloti* shows multicellular swarming migration and is impaired in nodulation efficiency on alfalfa roots. Mol. Microbiol. 43, 371-382.
 40. LENOIR, N. 1996. La ética de la ciencia: entre humanismo y modernidad. Unesco.
 41. ALMALLAH, M.K., DAVEY, M.R., COCKING, E.C. 1989. Formation of nodule structures on rice seedlings by rhizobia. J. Exp. Bot. 40, 473-478.
 42. SEARLE, I.R., MEN, A.F., LANIYA, T.S., BUZAS, O.M., ITURBE-ORMAECHE, I., CARROL, B.J., GRESSHOFF, P.M. 2003. Long distance signaling in nodulation directed by a CLAVATA1-like receptor kinase. Science 299, 109-112.
 43. VASIL, I.K. 2003. The science and politics of plant biotechnology - a personal perspective. Nature Biotech. 21, 849-851.

CONTESTACIÓN DEL
EXCMO. SR. D. ALBERTO RAMOS CORMENZANA

Excmo. Sr. Presidente
Excelentísimos e Ilustrísimos Sres.
Señoras y Señores

Es una gran satisfacción en el día de hoy recibir a un nuevo miembro de la Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada, no solo por el hecho de que la institución se enriquezca con este nuevo valor sino por la especial significación del momento, ya que me toca a mí en nombre de la Academia, recibir no solo al eminente científico; sino también al amigo y compañero.

Convergemos como discípulos del mismo maestro el Profesor Vicente Callao Fabregat; y tuvimos el honor de tener como compañero en nuestros inicios a quién fue excelente científico y miembro de esta Academia Prof. Enrique Montoya Gómez e igualmente compartimos en la propia Facultad las entrañables enseñanzas de D. Luis Recalde Martínez, quién a su vez fue nuestro director en la Estación Experimental del Zaidín y miembro de esta Academia, para mi es imposible recibir al nuevo Académico sin recordar con cierto tinte de nostalgia nuestros pasos comunes.

Además concurre otra circunstancia, pues el nuevo académico Olivares Pascual, fue el profesor amigo que guió mis comienzos en el campo de la microbiología corrigiendo mis numerosos errores como principiante, ha sido un modelo por su quehacer científico; y por esas paradojas que a veces tiene la vida me encuentro contestando al nuevo académico, cuando me pregunto si no debería haber sido al revés.

Temo carecer de la capacidad suficiente para trazar aquí su semblanza y exponer en unos pocos minutos los méritos que llevaron a nuestra Academia a designarlo como académico de número. Si fuese pintor reflejaría en un momento y con tres pinceladas los matices y aspectos que en estos momentos deseo plasmar, pero no lo soy, como científico no me queda otra posibilidad que intentar resumir toda la labor por él realizada.

El profesor de investigación D. José Olivares Pascual, nació en Granada (1935), cursó los estudios de la licenciatura de Farmacia, finalizándola en 1958, realiza los estudios del doctorado que finaliza en 1963. Sus actividades profesionales las realiza en su ciudad natal. Primero como Prof. Ayudante en la Facultad de Farmacia, para posteriormente trabajar en la Estación Experimental del Zaidín del C.S.I.C. sucesivamente como Ayudante, Colaborador e Investigador Científico.

En 1974 es nombrado Profesor de Investigación, cargo que sigue desempeñando en la actualidad.

Ha sido becario del Deutscher Akademischer Austauschdienst en Alemania años 1959 y 1960. Becario de la Fundación Juan March en 1961.

Su contribución en proyectos de investigación es realmente importante; ha participado en dieciocho y según me consta ha sido investigador principal en siete.

Debe resaltarse igualmente la extraordinaria calidad de sus 137 publicaciones científicas en revistas de primer nivel como Gene, J. Bacteriol., Science, J. Mol.Biol.; como pretendo no cansar a los asistentes, voy a pecar de parco, reflejaré tan solo algunos matices que pueden deducirse al observar la elevada calidad de su aportación. Puede que acostumbrado a evaluar los curriculum aprecio una excelente regularidad en su producción científica, diría una más que atractiva regularidad. Si se estableciera un promedio anual, se demostraría esa constancia en su investigación, pues sería de 1,4 en la década de los sesenta; 3,7 en los setenta, 3,8 en los ochenta y 3,3 en los noventa. En sus inicios trabajó en una amplia diversidad de temas como *Azotobacter*; Mixobacterias; fertilización; toxohormona de levadura, aunque la investigación actual sea constante en la simbiosis *Rhizobium*- Leguminosa. Deseo matizar su excelente contribución científica en capítulos de libros. Pero además, cuando uno observa el tipo de publicaciones, es fácil sorprenderse al encontrar por ejemplo, que dos de ellos ya se hubieran publicado, en prestigiosa revista Science, concretamente en los años 1963 y 1967, en aquella trascendente investigación sobre

la toxohormona, compartida con los Dres. Montoya y Callao.

Ha sido director de 12 Tesis Doctorales y varias Tesinas.

Su figura es de tal relevancia que desde 1998 son conocidas y demandadas sus publicaciones en la prensa diaria.

La calidad de sus publicaciones hace que haya sido requerido como Prof. Visitante en una enorme diversidad de Centros de Investigación y Universidades así ha acudido a las Universidad de: Sussex University, Brighton, RU, 1976; Universidad de Niza, Francia 1977; en algunas de forma repetida como la Universidad de Chile, que estuvo en los años 1979, 1981, 1985, 1987, 1988 (Convenio CSIC-U. de Chile); Universidad Autónoma de México, 1980; Pontificia Universidad Católica de Chile, 1979, 1988; Universidad de California, Davis, USA, 1981; Universidad de Utah, Salt Lake City, USA, 1985; Universität Bielefeld, Bielefeld, Alemania, 1991; y al Centro de Investigaciones Biológicas de la Academia Húngara de Ciencias en Szeged, Hungría 1983; Fundación Campomar, Buenos Aires, Argentina, 1981, 1985, 1987, 1988, 1989 (Convenio CSIC-CONYCET); Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, México, 1982, 1992; All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology. San Petesburgo, Rusia (1999); Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan (2000).

Es Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia.

Tan excepcional labor de investigación y curricular ha tenido repercusión al ser designado como Vocal de la Comisión Científica del CSIC (1987-1993). Vocal de la Junta de Gobierno del CSIC (1989-1990). Vocal de la Comisión del Área de Ciencias Agrarias del CSIC (1993-95). Coordinador del Área de Ciencias Agrarias del CSIC (1995-1996). Evaluador de Proyectos del Programa BIOTECH de la UE (III y IV PM). Vocal (1991-94) y posteriormente Presidente (1995-) de la Ponencia de Ciencias de la Vida del Plan Andaluz de Investigación, con quién tuve la oportunidad de compartir labor y trabajo durante varios años observando su excelente rigor y criterio científico.

Este es tan solo, un pequeño resumen del extenso historial científico del Profesor de Investigación Olivares Pascual que llevó a nuestra Corporación a la decisión de elegirlo Académico Numerario de la misma.

Pero sí, existe algo que personalmente me gustaría resaltar, los gratos momentos de trabajo con él compartidos, su carácter afable, gran humanidad y otro rasgo imposible de dejar de destacar, su extraordinaria timidez que presiento no es más que una maravillosa humildad perfectamente encubierta.

Por lo que respecta al trabajo que ha presentado con motivo de su ingreso en la Academia y que Vds.

acaban de oír, quiero transmitir en primer lugar mi felicitación al Prof. Olivares Pascual por su extraordinaria disertación, que considero refleja fielmente la labor por él realizada, durante cuarenta cortos años y tan llenos de buen hacer.

Recuerdo que en mi incorporación a la Estación Experimental del Zaidín era tan solo un género el que se conocía de la simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa. Sin embargo, hoy con un gran avance en el conocimiento se habla de otros muchos géneros, dentro de este grupo de proteobacterias, concretamente las α -proteobacteria o Alfabacteria, según otros autores. Aunque se haya discutido por los especialistas en taxonomía bacteriana respecto a la base sistemática que deba prevalecer, hoy día se conocen los géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*, que tanta repercusión tienen en el campo de la ciencia. El Prof. Olivares Pascual, aunque señala la existencia de otros géneros, ha sintetizado todo en el género *Rhizobium*, con un ligero comentario respecto al trabajo de Broughton “rosas por nombres”; posiblemente para poder llegar de forma fácil y asequible a esta respetable audiencia.

Paso a paso, hace referencia a las cuatro décadas de investigación y estudio de esta simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, en su intervención mencionaba a Machado, si yo ahora repitiera ese caminante no hay camino se hace camino al andar, golpe a golpe, verso a verso, como dice Machado, comprenderíamos que ese paso a paso científico, es la vía de los grandes avances en el camino

de la ciencia. El enorme contenido de la labor científica, por él realizada da la impresión que esas cuatro décadas son un siglo de fructificación.

Ha destacando la vertiente práctica de esa investigación, como muy bien sabe hacerlo; ha señalado, y no es precisamente ciencia ficción, que los cultivos fuentes de alimento de prácticamente el mundo entero sean capaces de fijar el nitrógeno, por si mismos o asociados con las bacterias del grupo *Rhizobium*. El interés práctico de estos microorganismos, está más que contrastado como lo prueban la comercialización y utilización de los mismos desde hace ya muchos años como los ejemplos del “nitragin” utilizado y comercializado por los rusos o el “leguminal-aid de los americanos.”

Comentaba al referirme a esta fecha la especial significación del día y de alguna forma sigue siendo especial en su intervención al recordarme a científicos prestigiosos a quienes he tenido la oportunidad de conocer y relacionarme como John Postgate y Johanna Döbereiner. Concretamente mantengo un recuerdo especial de Johanna Döbereiner, quién de alguna manera tuvo un significado especial en mi carrera como científico.

Decía el nuevo académico que le resultaría difícil escoger el tema porque “darle vueltas a lo que por más de cuarenta años ha sido el objeto de su investigación, lo único que puede causar es cansancio y aburrimiento en la audiencia”, sin embargo su intervención ha sido de tal

simplicidad y amenidad que quiero pensar ha conseguido transmitir interés y expectación en la audiencia, de tal forma estoy seguro, que incluso los no versados, la habrán podido seguir con el máximo interés y presumiblemente sin ninguna dificultad.

Su intervención refleja toda una labor de investigación, cuesta trabajo resaltar algo más importante que lo demás. Son numerosos los trabajos y resultados en los que se muestra pionero, por ejemplo cuando incorpora la técnica de los anticuerpos fluorescentes en el estudio de la simbiosis leguminosa; cuando lograron detectar la existencia plásmidos en el género *Rhizobium*, no debemos olvidar que precisamente con su grupo de investigación fueron los primeros en observar la presencia de estos elementos genéticos e igualmente contribuyeron en el mapeo genético del *Rhizobium* en circunstancias en las que era más difícil el estudio, pues todavía no se encontraban suficientemente sofisticadas las técnicas de biología molecular. Debe resaltarse lo dinámico de su investigación, fruto de estar al tanto del avance de la ciencia, para conseguir grandes logros y aportar valores a la investigación realizada por los demás; creo que eso pudo ser herencia de nuestro querido y recordado maestro D. Vicente Callao.

De su exposición es fácil deducir lo que se puede conseguir con una constante labor de trabajo, realmente el Prof. de Investigación Olivares Pascual es modelo a seguir para los jóvenes investigadores, y la excelente producción científica es fruto de su preparación y esfuerzo, como decía Luis Pasteur “la casualidad

científica solo se da en personas científicamente preparadas”, y él es uno de los científicos mejor preparados en el conocimiento de la asociación *Rhizobium*-Leguminosa.

Ha cuidado tanto su intervención que no podía omitir el mínimo de los detalles, por ello no ha dejado en el olvido el sistema de comunicación de las bacterias el llamado “quorum-sensing”, que nos permite conocer ese sistema de transmisión de la información biológica y precisamente nos demuestra lo maravilloso de la biología. Lo que de alguna manera antes se ignoraba, hoy día representa, como muy bien ha señalado el Prof. Olivares Pascual el primer eslabón “de la cadena que va desde el organismo unicelular al pluricelular”, o como a veces sugiero en mis clases lo que debería ser modelo de comunicación para el ser humano. La formación de biopelículas hace que las bacterias funcionen como un todo, es decir representa para los microorganismos la colaboración conjunta para establecer al unísono su vivienda, donde se albergaran esos u otros grupos microbianos constituyentes del nicho biológico. Son variados los sistemas de comunicación, la formación de compuestos como los flavonoides pueden señalar un fin de viaje, exceso de población, pero indudablemente para nosotros representa un excelente modelo de comportamiento y colaboración biológica. ¡Ojalá los humanos tuviéramos esa positiva capacidad de comunicación!

Finalmente ha hecho referencia a lo mucho que la Academia, como conjunto de personas con alta

formación en las distintas ramas de la ciencia, tiene que decir en la formación integrada del universitario, y por tanto de la sociedad en general.

Considero que nos podemos felicitar con el ingreso del nuevo académico porque llega en uno de los mejores momentos de su vida, lleno de contenido como científico, con la mayor de las experiencias y la ilusión “siempre viva” como muy bien ha dicho; ¡gracias por el excelente discurso! estoy seguro de lo mucho que hemos ganado con tu incorporación a nuestra Academia.

Los resultados obtenidos, tan magistralmente expuestos por el prof. Olivares Pascual, demuestran como dice Anton Chejov “que sobre su mesa no hay nada casual. Todo hasta la más pequeña bagatela lleva impreso un sello de premeditación y parece sujeto a un rígido programa”, espero que la brillante intervención del prof. Olivares, sea el inicio de la labor que va a realizar en nuestra Academia y que contribuirá al mejor desarrollo de la misma.

He dicho