



# IX REUNIÓN NACIONAL DEL METABOLISMO DEL NITRÓGENO

Organizado por:

**SEBBM**  
**SEBBM**  
Sociedad Española de Bioquímica  
y Biología Molecular



**Universitat d'Alacant**  
**Universidad de Alicante**  
Departamento de Agroquímica y Biología  
División de Bioquímica y Biología Molecular



**23 - 25 ABRIL 2008**  
Edificio Germán Bernácer  
Universidad de Alicante

Secretaría científica: [bioquimica@ua.es](mailto:bioquimica@ua.es)  
Secretaría técnica: [nitrogeno08@sri.ua.es](mailto:nitrogeno08@sri.ua.es)

Colaboran

**Universitat d'Alacant**  
**Universidad de Alicante**  
Vicectorat d'Extensió Universitària  
Vicectorado de Extensión Universitaria

  
Productos Químicos de Murcia, S.R.

 Agilent Technologies

 **PROQUILAB S.A.**  
PRODUCTOS QUÍMICOS LABORATORIOS, S.A.

 GENERALITAT VALENCIANA

 **JASCO** Complete Process

 **FELIZ CAMINAB**

 **SARSTEDT**

 **akralab**

[www.sri.ua.es/congresos/Nitrogeno08/index.html](http://www.sri.ua.es/congresos/Nitrogeno08/index.html)

# IX REUNIÓN NACIONAL DEL METABOLISMO DEL NITRÓGENO

## ALICANTE 2008

### COMITÉ ORGANIZADOR

**Presidenta:**

Bonete Pérez, M<sup>a</sup> José

**Vocales:**

Bautista Saiz, Vanesa

Bravo Barrales, Gloria

Camacho Carrasco, Mónica

Díaz González, Susana

Esclapez Espliego, Julia

LLorca Alcaraz, Francisco

Martínez-Espinosa, Rosa María

Pedro Roig, Laia

Pérez Pomares, Francisco

Pire Galiana, Carmen

Zafrilla Requena, Basilio

### COMITÉ CIENTÍFICO

**Presidente:**

Aparicio Tejo, Pedro M.

**Vocales:**

Aparicio Alonso, Pedro

Bedmar Gómez, Eulogio

Berenguer Carlos, José

Bonete Pérez, María José

Cánovas Ramos, Francisco M.

Castillo Rodríguez, Francisco

Díez Dapena , Jesús

Fernández Reyes, Emilio

Florencio Bellido, Francisco J.

Flores García, Enrique

González Murúa, Carmen

Llama Fontal, María Jesús

Lluch Pla, Carmen

Maldonado Ruíz, José M.

Márquez Cabeza, Antonio J.

Moreno Vivián, Conrado

Pineda Priego, Manuel

Rubio Zamora, Vicente

Serra Ferrer, Juan Luís

Siverio Expósito, José M.

Vega Piqueres, José M.

## ÍNDICE

<b>1.- Programa científico</b>	<b>3</b>
<b>2.- Resúmenes de las comunicaciones</b>	
<b>- Sesión N1. Transporte y reducción de nitrato y nitrito</b>	
Conferencia temática	10
Comunicaciones orales	11
Comunicaciones mediante póster	17
<b>- Sesión N2. Transporte y asimilación de amonio, aminoácidos y ureidos</b>	
Conferencia temática	24
Comunicaciones orales	25
Comunicaciones mediante póster	30
<b>- Sesión N3. Fijación de N<sub>2</sub> y desnitrificación</b>	
Conferencia temática	44
Comunicaciones orales	45
Comunicaciones mediante póster	50
<b>- Sesión N4. Relación entre el metabolismo del carbono, nitrógeno y azufre</b>	
Conferencia temática	54
Comunicaciones orales	55
Comunicaciones mediante póster	61
<b>- Sesión N5. Aplicaciones agronómicas, industriales y medioambientales</b>	
Conferencia temática	68
Comunicaciones orales	69
Comunicaciones mediante póster	76
<b>3.- Índice de participantes</b>	<b>89</b>
<b>4.- Dirección electrónica de los participantes</b>	<b>92</b>

## PROGRAMA CIENTÍFICO

### Miércoles 23 de Abril

**16:00-18:00** Recogida de documentación. Colocación de pósters.

**18:00-18:15** Bienvenida a los participantes.

#### **18:15 Sesión Inaugural**

Presidentes: Pedro Aparicio Tejo y María José Bonete

**18:30-19:30. Conferencia Inaugural:** "Nitric oxide detoxification in enteric pathogenic bacteria". **D. Richardson.** *University of East Anglia (UEA), Norwich, United Kingdom*

**20:30** Cocktail de Bienvenida.

### Jueves 24 de Abril

#### **Sesión N1. Transporte y reducción de nitrato y nitrito.**

Presidentes: Jesús Díez y Eulogio Bedmar

**8:30-9:00 Conferencia temática:** Transporte y reducción de nitrato y nitrito en *Chlamydomonas*. **E. Fernández Reyes,** Á. Llamas, M. Tejada-Jiménez, A. Camargo, V. Mariscal, A. de Montaigu, E. Sanz-Luque, J. J. Higuera, D. González-Ballester y A. Galván. *Universidad de Córdoba*

**9:00-9:15** Una guanilato ciclasa dependiente de óxido nítrico implicada en la regulación negativa de la asimilación de nitrato en *Chlamydomonas*. **E.Sanz-Luque,** A. de Montaigu, A. Galván y E. Fernández *Universidad de Córdoba.*

**9:15-9:30** Purificación y caracterización de la nitrorreductasa NprB de *Rhodobacter capsulatus*. **R. Gómez-Cruz,** E. Pérez-Reinado, M. D. Roldán, F. Castillo y C. Moreno-Vivián. *Universidad de Córdoba.*

**9:30-9:45** Caracterización del gen *pipX*, implicado en la transducción de señales de nitrógeno en *Synechococcus* sp. PCC 7942. **J. Espinosa,** K. Laichoubi, M. Ángel Castells y A. Contreras. *Universidad de Alicante.*

**9:45-10:00** Regulación de la asimilación de nitrato en la cianobacteria filamentosa formadora de heterocistos *Anabaena* sp. PCC 7120. **J. E. Frías,** A. Herrero y E. Flores. *Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad de Sevilla.*

**10:00-10:15** Algunos avances en los transportadores de nitrato/nitrito en levaduras. **J. M. Siverio,** Y. Martín, F. Navarro, E. Cabrera, R. González, Y. González, C. Rodríguez, B. Medina y A. Lancha. *Universidad de la Laguna.*

**10:15-10:45 Presentación Agilent.** Aportaciones de la Espectrometría de Masas en Estudios Metabólicos. Ejemplo de estudio: "Cambios en el perfil metabólico del arroz causados por el ataque de una bacteria." **Isidre Massana.**

**10:45-11:15 Café y visita a pósters**

## **Sesión N2. Transporte y asimilación de amonio, aminoácidos y ureidos.**

Presidentes: Francisco J. Florencio y José M. Maldonado

**11:15-11:45 Conferencia temática.** Regulación transcripcional de Glutamina Sintetasa de pino. **C. Ávila**, M. Rueda, R. Crespillo y F. M. Cánovas. *Universidad de Málaga.*

**11:45-12:00** Regulación fisiológica y caracterización de la GDH de *Prochlorococcus*. **O. Rangel**, G. Gómez-Baena, A. López-Lozano, J. M. García-Fernández y J. Díez Dapena. *Universidad de Córdoba.*

**12:00-12:15** Efectos de la deficiencia en boro sobre la expresión del gen de la asparagina sintetasa en plantas de tabaco. Regulación por la fuente de nitrógeno y los niveles de carbohidratos. **J. Rexach**<sup>(1)</sup>, V. M. Beato<sup>(1)</sup>, M. T. Navarro-Gochicoa<sup>(1)</sup>, J. J. Camacho-Cristóbal<sup>(1)</sup>, M. B. Herrera-Rodríguez<sup>(1)</sup>, J. M Maldonado<sup>(2)</sup> y A. González-Fontes<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *Universidad Pablo de Olavide, Sevilla.* <sup>(2)</sup> *Universidad de Sevilla.*

**12:15-12:30** Expresión heteróloga y mutagénesis de asparraginasa K<sup>+</sup>- dependiente *Lotus japonicus*. **A. Credali**<sup>(1)</sup>, J. Perry<sup>(2)</sup>, M. Parniske<sup>(4)</sup>, T. Wang<sup>(3)</sup> y A. J. Márquez<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *Universidad de Sevilla.* <sup>(2)</sup> *The Sainsbury Laboratory and* <sup>(3)</sup> *John Innes Centre, Norwich.* <sup>(4)</sup> *Ludwig-Maximilian-Universität, Munich.*

**12:30-12:45** El sistema génico *hpx* de *K. pneumoniae*, implicado en la utilización de purinas como fuentes de nitrógeno, está sometido a una doble regulación: por niveles de nitrógeno y por presencia de purinas. **L. de la Riva**, N. Murtra, J. Badía, J. Aguilar, R.A. Bender y L. Baldomà. *Universitat de Barcelona.*

**12:45-13:00** Metabolismo de ureidos durante el desarrollo de la plántula de judía (*Phaseolus vulgaris*). **F. A. Quiles**, P. Piedras y M. Pineda. *Universidad de Córdoba.*

**13:00-15:00 Comida**

### **Sesión N3. Fijación de N<sub>2</sub> y desnitrificación (Dedicada al Prof. Antonio J. Palomares)**

Presidentes: Carmen Lluch y Eloisa Pajuelo

**15:00-15:15** Recordando a Antonio Palomares. **C. Lluch** (*Universidad de Granada*) y **E. Pajuelo** (*Universidad de Sevilla*)

**15:15-15:45 Conferencia temática.** “Sustitución del complejo bc por la nitrato reductasa durante el transporte de electrones hacia la nitrito, la óxido nítrico y la óxido nitroso reductasas en *Thermus thermophilus*”. F. Cava, Z. Chahlaflí, L. Alvarez y **J. Berenguer**. *Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. UAM-CSIC. Madrid.*

**15:45-16:00** Implicación de NifA y FixK<sub>2</sub> en la Desnitrificación. **E. Bueno**<sup>(1)</sup>, S. Mesa<sup>(2)</sup>, E. J. Bedmar<sup>(1)</sup> y M. J. Delgado<sup>(2)</sup>. <sup>(1)</sup> *Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.* <sup>(2)</sup> *Institute of Microbiology, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich.*

**16:00-16:15** Metabolismo del óxido nítrico en nódulos de soja. **C. Sánchez**<sup>(1)</sup>, T. Uchiumi<sup>(2)</sup>, E. J. Bedmar<sup>(1)</sup> y M. J. Delgado<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.* <sup>(2)</sup> *Kagoshima University, Japan.*

**16:15-16:30** Haloarqueas desnitrificantes: ¿biorremediadores o contribuidores al cambio climático?. **R. M. Martínez-Espinosa**<sup>(1)</sup>, D. J. Richardson<sup>(2)</sup> y M. J. Bonete<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *Universidad de Alicante.* <sup>(2)</sup> *University of East Anglia (UEA), Norwich.*

**16:30-16:45** Caracterización de la proteína NnrR como activador transcripcional de los genes de la desnitrificación en *Bradyrhizobium japonicum*. E.F. Robles<sup>(1)</sup>, F. Cutruzzolà<sup>(2)</sup>, T. Krell<sup>(3)</sup>, M.J. Delgado<sup>(1)</sup> y **E J. Bedmar**<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *Dep. Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.* <sup>(2)</sup> *Dep. Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Granada.* <sup>(3)</sup> *University of Rome La Sapienza, Rome.*

**16:45-17:00** Mecanismos de comunicación intercelular en la cianobacteria filamentosa *Anabaena* sp. PCC. 7120. **V. Mariscal**, V. Merino-Puerto, R. Pernil, A. Herrero y E. Flores. *Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC. Sevilla.*

**17:00-17:30** Café y visita a pósters

**17:30** Excursión a Elche

## Viernes 25 de Abril

### **Sesión N4. Relación entre el metabolismo del carbono, nitrógeno y azufre.**

Presidentes: Francisco Cánovas y María Jesús Llama

**8:30-9:00 Conferencia temática.** Regulación de la interacción carbono/nitrógeno en *Prochlorococcus*. **J. M. García-Fernández**, A. López-Lozano, G. Gómez, O. A. Rangel, F. Toribio y J. Diez. *Universidad de Córdoba*.

**9:00-9:15** Metabolismo de carbono y nitrógeno en plantas de *Lotus japonicus* sometidas a estrés hídrico: un estudio de transcriptómica. **M. Betti**<sup>(1)</sup>, P. Díaz<sup>(1-2)</sup>, D. Sánchez<sup>(3)</sup>, J. Monza<sup>(2)</sup> y Antonio Márquez<sup>(1)</sup>.<sup>(1)</sup> *Universidad de Sevilla*.<sup>(2)</sup> *Universidad de la República, Montevideo-Uruguay*.<sup>(3)</sup> *Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology, Wissenschaftspark Golm, Alemania*.

**9:15-9:30** Mecanismo de regulación postraduccional de la Glutamina Sintetasa de tipo I en cianobacterias. **C. V. Galmozzi**, L. Saelices L, F. J. Florencio y M. I. Muro-Pastor. *Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, CSIC. Sevilla*.

**9:30-9:45** Glutamato Descarboxilasa y producción de GABA asociado al desarrollo de plántulas de pino. **J. J. Molina**<sup>(1)</sup>, M. B. Pascual<sup>(2)</sup>, J. Pissarra<sup>(2)</sup>, F. M. Cánovas<sup>(1)</sup> y F. Gallardo<sup>(1)</sup>.<sup>(1)</sup> *Universidad de Málaga e Instituto Andaluz de Biotecnología*.<sup>(2)</sup> *Instituto de Biología Molecular e Celular (IBMC), Porto*.

**9:45-10:00** Transporte de glucosa en *Prochlorococcus*. **G. Gómez-Baena**<sup>(1)</sup>, A. López-Lozano<sup>(1)</sup>, J. Gil-Martínez<sup>(2)</sup>, J. M. Lucena<sup>(2)</sup>, J. Diez<sup>(1)</sup>, P. Candau<sup>(2)</sup> y J. M. García-Fernández<sup>(1)</sup>.<sup>(1)</sup> *Universidad de Córdoba*.<sup>(2)</sup> *Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla, CSIC*.

**10:00-10:15** Papel de SipA en la transducción de señales de nitrógeno e interacciones con los reguladores non bleaching NblS y NblR. D. Ruiz, P. Salinas y R. Cantos y **A. Contreras**. *Universidad de Alicante*.

**10:15-10:30** Bases estructurales de la señalización mediada por la proteína PII: Estructura del complejo de la proteína PII con su diana cianobacteriana, la proteína PipX. **J. L. LLácer**<sup>(1)</sup>, I. Fita<sup>(2)</sup> y V. Rubio<sup>(1)</sup>.<sup>(1)</sup> *Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC)*.<sup>(2)</sup> *Instituto de Biología Molecular de Barcelona*.

**10:30-11:00** Café y visita pósters

## Sesión N5. Aplicaciones agronómicas, industriales y medioambientales.

Presidentes: Pedro Aparicio Tejo y Francisco Castillo

**11:00-11:30 Conferencia temática:** Cianotrofia: biodegradación y asimilación del cianuro y sus derivados por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. **C. Moreno-Vivián**<sup>(1)</sup>, V. M. Luque-Almagro<sup>(1)</sup>, M. J. Huertas<sup>(1)</sup>, L. P. Sáez<sup>(1)</sup>, M. P. Escribano<sup>(1)</sup>, M. Martínez-Luque<sup>(1)</sup>, R. Blasco<sup>(2)</sup>, M. D. Roldán<sup>(1)</sup> y F. Castillo<sup>(1)</sup>.  
<sup>(1)</sup> *Universidad de Córdoba.* <sup>(2)</sup> *Universidad de Extremadura.*

**11:45-12:00** Bioensayo para detectar la nitración de proteínas usando como diana la Fe-superóxido dismutasa de cowpea (*Vigna unguiculata*). **E. Urarte**<sup>(1)</sup>, E. Larrainzar<sup>(2)</sup>, I. Ariz<sup>(1)</sup>, A. Lantero<sup>(1)</sup>, I. Auzmendi<sup>(2)</sup>, C. Arrese-Igor<sup>(2)</sup>, E. M. González<sup>(2)</sup> y J. F. Moran<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC.* <sup>(2)</sup> *Dep. Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra.*

**12:00-12:15** Estudio del estrés nutricional por nitrógeno mediante una aproximación genómica en *Pinus pinaster* Ait. **J. Canales**<sup>(1)</sup>, C. Ávila<sup>(1)</sup>, D. Pacheco<sup>(1)</sup>, S. Díaz<sup>(1)</sup>, D. Ariza<sup>(2)</sup>, R. M. Navarro<sup>(2)</sup>, F. R. Cantón<sup>(1)</sup>, M. F. Suárez<sup>(1)</sup>, M. G. Claros<sup>(1)</sup>, y F. M. Cánovas<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *Universidad de Málaga.* <sup>(2)</sup> *Universidad de Córdoba.*

**12:15-12:30** Acumulación de prolina y eficiencia en el uso del agua en cultivares de *Trifolium pratense*. E. Casaretto<sup>(1)</sup>, J. Monza<sup>(1)</sup>, A. J. Márquez<sup>(2)</sup>, M. Rebuffo<sup>(3)</sup>, **P. Díaz**<sup>(1)</sup> y O. Borsani<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *Universidad de la República, Montevideo.* <sup>(2)</sup> *Universidad de Sevilla.* <sup>(3)</sup> *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuaria (INIA) Estanzuela, Colonia.*

**12:30-12:45** Estudios de termoluminiscencia y fluorescencia de clorofila en plantas de *Lotus japonicus* silvestres y mutantes sometidas a estrés hídrico. **M. García-Calderón**<sup>(1)</sup>, P. Díaz<sup>(1-2)</sup>, M. Roncel<sup>(3)</sup>, J. M. Ortega<sup>(3)</sup> y A. J. Márquez<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *Universidad de Sevilla.* <sup>(2)</sup> *Universidad de Montevideo.* <sup>(3)</sup> *Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla-CSIC.*

**12:45-13:00** Avances en la resistencia al cianuro y en el metabolismo de la 3-CN-Ala por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. **F. Acera**, M. Guijo, G. Gutiérrez, A. Quesada y R. Blasco. *Universidad de Extremadura.*

**13:00-13:15** Estudio proteómico y aplicaciones biotecnológicas de la biodegradación de cianuro por *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. **M. J. Huertas**<sup>(1)</sup>, V. M. Luque-Almagro<sup>(1)</sup>, M. P. Escribano<sup>(1)</sup>, M. Martínez-Luque<sup>(1)</sup>, I. García<sup>(2)</sup>, R. Blasco<sup>(3)</sup>, C. Moreno-Vivián<sup>(1)</sup>, M. D. Roldán<sup>(1)</sup> y F. Castillo<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *Dep. Bioquímica y Biología Molecular. Universidad de Córdoba.* <sup>(2)</sup> *Dep. Ingeniería Química. Universidad de Córdoba.* <sup>(3)</sup> *Universidad de Extremadura.*

**13:15-13:30** Efecto del manejo de la fertilización nitrogenada sobre la senescencia en plantas de trigo. **T. Fuertes**<sup>(1)</sup>, A. González<sup>(1)</sup>, A. M. Zamarreño<sup>(2)</sup>, J. M. García-Mina<sup>(2)</sup>, J. M. Estavillo<sup>(1)</sup> y M. B. González-Moro<sup>(1)</sup>. <sup>(1)</sup> *UPV-EHU, Bilbao.* <sup>(2)</sup> *Inabonos SA-Grupo Roullier, Orcoyen (Navarra).*

**13:30-15:30 Comida**



**15:30 -16:30 Visita Pósteres**

**16:30 – 18:00 Sesión y conferencia de clausura.**

Presidentes: José M. Vega y Francisco Castillo

**16:30-17:00** Vivencias con Pedro Aparicio en Sevilla y resto del mundo. **José M. Vega.** *Universidad de Sevilla.*

**17:00-17:30** Mis andanzas con Pedro: Desde Gelves hasta la Selva Negra, pasando por Jarandilla y Sorrento. **Francisco Castillo.** *Universidad de Córdoba.*

**17:30-18:00 Conferencia de Clausura:** Metabolismo del Nitrógeno y Fotosíntesis. **Pedro J. Aparicio Alonso.** *Centro de Investigaciones Biológicas. CSIC. Madrid.*

**18:30. Visita MARQ (Museo Arqueológico)**

**21:00 Cena de Clausura**

## RESÚMENES DE LA SESIÓN N1

Transporte y reducción  
de nitrato y nitrito

## STRATEGIES FOR NITRIC OXIDE DETOXIFICATION BY ENTERIC BACTERIAL PATHOGENS

David Richardson.

*University of East Anglia, Norwich, United Kingdom, NR4 6PZ.*

d.richardson@uea.ac.uk

The enteric bacterium *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is a pathogen that is highly adapted for both intracellular and extracellular survival in a range of oxic and anoxic environments. The cytotoxic radical nitric oxide (NO) is encountered in many of these environments. Protection against NO may involve reductive detoxification in low-oxygen environments, and three enzymes, flavorubredoxin (NorV), flavohaemoglobin (HmpA) and cytochrome c nitrite reductase (NrfA), have been shown to reduce NO *in vitro*. We have determined the role of these three enzymes in NO detoxification by *Salmonella* by assessing the effects of all eight possible combinations of *norV*, *hmpA* and *nrfA* single, double and triple mutations. The mutant strains were cultured and exposed to NO following either glucose fermentation (when nitrite reductase activity is low), or anaerobic respiration (when nitrite reductase activity is high). Wild-type cultures were more sensitive to the addition of a pulse of NO when grown under fermentative conditions compared with anaerobic respiratory conditions. Analysis of the mutant strains suggested an important additive role for both NorV and NrfA in both environments, since the *norV nrfA* mutant could not grow after NO addition. The results also suggested a minor role for HmpA in anaerobic detoxification of NO under the two growth conditions, and a larger role for HmpA in aerobic NO detoxification was confirmed. Activity assays and measurements of NO consumption showed that increased nitrite reductase activity correlates with an elevated capacity for NO reduction by intact cells. Taken together, the results reveal a combined role for NorV and NrfA in NO detoxification under anaerobic conditions, and highlight the influence that growth conditions have on the sensitivity to NO of this pathogenic bacterium. NrfA is an important part of this NO detoxification process and we have determined the structure of this protein from *Escherichia coli*. It is a deca-heme protein that forms a 20-heme complex with its redox partner NrfB. We have demonstrated that it can indeed serve as an NO reductase *in vitro*, confirming the *in vivo* results.

### Reference:

Mills PC, Rowley G, Spiro S, Hinton JC, Richardson DJ. (2007) A combination of cytochrome c nitrite reductase (NrfA) and flavorubredoxin (NorV) protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium against killing by NO in anoxic environments. *Microbiology*. 2008 154:1218-28.

## TRANSPORTE Y REDUCCIÓN DE NITRATO Y NITRITO EN *Chlamydomonas*

**Emilio Fernández, Ángel Llamas, Manuel Tejada-Jiménez, Antonio Camargo, Vicente Mariscal, Amaury de Montaigu, Emanuel Sanz-Luque, José J. Higuera, David González-Ballester, Aurora Galván**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, Edif. Severo Ochoa, planta baja. 14071 Córdoba.*

La ruta de asimilación de nitrato y nitrito en *Chlamydomonas* es estructuralmente sencilla y similar a la de plantas: Dos pasos de transporte a través de membrana y dos de reducción. La expresión de los elementos estructurales se encuentra finamente regulada a nivel transcripcional, positivamente por nitrato y negativamente por amonio o los productos de su asimilación. No obstante, se desconocen molecularmente los genes que participan en estas regulaciones. Utilizando el alga unicelular *Chlamydomonas*, nuestro grupo ha estudiado en primer lugar los pasos de transporte de alta afinidad de nitrato y nitrito, que están mediados por NRT2/NAR2 a través de la membrana plasmática y NAR1 a través de la membrana del cloroplasto. La complejidad de los sistemas de transporte en un organismo unicelular eucariota como *Chlamydomonas* es comparable a la de plantas como *Arabidopsis*. Asimismo, se ha identificado un transportador de molibdato necesario para una asimilación eficiente de nitrato y se ha estudiado en detalle la proteína de transferencia del cofactor de molibdeno de la nitrato reductasa. Hemos obtenido una colección de mutantes insercionales del alga con objeto de etiquetar sus genes no esenciales y poder identificar mediante escrutinio aquellos implicados en la regulación de la ruta. Para ello se ha utilizado como informador la construcción quimérica del gen de arilsulfatasa bajo control del promotor del gen de nitrato reductasa (*NIA1*). Se ha identificado así el gen de regulación positiva que media los efectos del nitrato (*NIT2*) y que es esencial para el crecimiento en nitrato. *NIT2* corresponde a un factor transcripcional con un motivo RWP-RK en otro de cremalleras de leucina, no relacionado estructuralmente con los factores transcripcionales para la asimilación de nitrato de hongos y levaduras. También se han identificado otros genes para regulación positiva por nitrato y negativa por amonio, que señalan a un importante grado de complejidad.

Financiado por MEC (BFU2005-07521)

## UNA GUANILATO CICLASA DEPENDIENTE DE ÓXIDO NÍTRICO IMPLICADA EN LA REGULACIÓN NEGATIVA DE LA ASIMILACIÓN DE NITRATO EN *Chlamydomonas*

Emanuel Sanz-Luque, Amaury de Montaigne, Aurora Galván, Emilio Fernández

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, Edif. Severo Ochoa, planta baja. 14071 Córdoba. España*

*Chlamydomonas* utiliza fundamentalmente el nitrógeno inorgánico (amonio, nitrito y nitrato) como fuente de nitrógeno y como nutriente. Sin embargo, la forma reducida (amonio) es preferida a las formas oxidadas (nitrato, nitrito). La regulación negativa por amonio de la asimilación de nitrato es un hecho bien conocido (1) así como su efecto a nivel transcripcional como postranscripcional. Sin embargo, no se conocen los mecanismos de regulación ni los efectores implicados. En un intento de entender esta regulación negativa se han aislado 40 mutantes insensibles a amonio a partir de una colección 22000 mutantes etiquetados y que son objeto de estudio en nuestro laboratorio (2). Estudios preliminares indican que la insensibilidad a amonio es un fenotipo dependiente de la concentración. La sensibilidad a amonio implica una ruta compleja en la que participarían muchos genes/proteínas. En efecto, se ha identificado la región génica afectada en muchos de estos mutantes, lo que confirma el carácter multigénico de la sensibilidad a amonio.

En este trabajo nos centramos en un mutante en donde la etiqueta se ha integrado en un gen que codificaría para una guanilato ciclasa. Esta proteína presenta dos dominios conservados, uno catalítico de guanilato ciclasa, y otro HNOB de unión de óxido nítrico propio de GCs de tipo soluble. Este gen presenta una regulación por nitrógeno siendo su expresión óptima en medios con nitrato más amonio.

Se ha visto también que la expresión de este gen está afectada en otros mutantes aislados de la colección y etiquetados en otros genes independientes de éste, lo que apunta hacia una posible ruta de control transcripcional. La implicación de esta guanilato ciclasa en la regulación de la expresión de la nitrato reductasa y la presencia de un dominio GAF en NIT2, el único regulador positivo conocido del gen *Nia1*(3), indica una posible función del óxido nítrico y del GMPc como efectores en la señalización negativa de la asimilación de nitrato.

Financiado por MEC (BFU-2005-07521).

(1) Fernandez E. et al. (2007) J Exp Bot. 58(9), 2279-87

(2) González-Ballester D. et al. (2005) Plant Physiol. 137, 522-533

(3) Camargo A. et al. (2007) Plant Cell. Nov; 19(11):3491-503.

## PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA NITRORREDUCTASA NprB DE *Rhodobacter capsulatus*.

Gómez-Cruz R.<sup>1</sup>, Pérez-Reinado E.<sup>1</sup>, Roldán M.D.<sup>1</sup>, Castillo F.<sup>1</sup>, Moreno-Vivián C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 1ª Planta. Universidad de Córdoba. E-14071, Córdoba, España.

Las nitrorreductasas (NR) bacterianas poseen un gran interés biotecnológico por su aplicación en procesos de biodegradación, biorremediación y terapias antitumorales. Las NR son flavoproteínas dependientes de NAD(P)H como donador de electrones y catalizan la reducción del grupo nitro en una amplia gama de sustratos, para producir los correspondientes derivados hidroxilamino y/o amino (1). *Rhodobacter capsulatus* es una bacteria fototrófica que es muy sensible a los desacoplantes como el 2,4-dinitrofenol (DNP). En presencia de este compuesto xenobiótico, *R. capsulatus* induce una NR que contiene FMN y reduce el DNP a 2-amino-4-nitrofenol (ANP), que se libera estequiométricamente al medio en condiciones de anaerobiosis-luz, aunque es degradado por la bacteria en condiciones de microaerobiosis. La NR de *R. capsulatus* es un dímero de 25 kDa por subunidad que utiliza principalmente NADPH como donador de electrones (2). En esta bacteria se han identificado dos genes que codifican posibles NR (3). El gen *nprA* codifica la principal NR dependiente de NADPH, que es inducible por diversos compuestos nitroaromáticos y nitroheterocíclicos y se regula negativamente por amonio. El gen *nprB* codifica una NR cuya expresión parece ser constitutiva. Estudios de mutagénesis dirigida han permitido establecer que ambos genes, *nprA* y *nprB*, son necesarios para el proceso de reducción de compuestos nitroaromáticos en *R. capsulatus* (3,4).

En este trabajo se ha hiperexpresado y purificado la NR codificada por el gen *nprB* con vista a su caracterización bioquímica y a su comparación con la enzima NprA previamente purificada y caracterizada (4). El pH y la temperatura óptimos de la actividad nitrorreductasa de la proteína NprB fueron de 6,9 y 34 °C, respectivamente (para la proteína NprA estos datos son 6,5 y 37 °C). En cuanto a la especificidad de sustratos, ambas proteínas NprB y NprA utilizan 2,4-dinitrobenzoato, pero la proteína NprB puede usar como sustrato el 2,4,6-trinitrotolueno (TNT), que no es utilizado por la proteína NprA, mientras que la proteína NprA utiliza DNP como sustrato preferente, pero NprB tiene baja actividad con este sustrato. La proteína NprB se inhibe casi un 100% con capsaicina, que por su estructura análoga en forma de quinona actúa como posible inhibidor competitivo por el sitio activo de la proteína (5), en tanto que la nitrorreductasa NprA mantiene casi un 50% de actividad en presencia de este inhibidor.

Este trabajo fue financiado por el MEC, proyecto BIO2005-07741-CO2-01.

- 1) Roldán MD, Pérez-Reinado E, Castillo F, Moreno-Vivián C. 2008. Reduction of polynitroaromatic compounds: the bacterial nitroreductases. FEMS Microbiol. Rev. En prensa.
- 2) Blasco R, Castillo F. 1993. Characterization of a nitrophenol reductase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus* E1F1. Appl. Environ. Microbiol. 59:1774-1778.
- 3) Pérez-Reinado E, Blasco R, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán MD. 2005. Regulation and characterization of two nitroreductase *nprA* and *nprB* genes of *Rhodobacter capsulatus*. Appl. Environ. Microbiol. 71:7643-7649.
- 4) Pérez-Reinado E, Roldán MD, Castillo F, Moreno-Vivián C. 2008. The NprA nitroreductase required for 2,4-dinitrophenol reduction in *Rhodobacter capsulatus* is a dihydropterine reductase. Environ. Microbiol. En prensa.

## CARACTERIZACIÓN DEL GEN *pipX*, IMPLICADO EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE NITRÓGENO EN *Synechococcus* sp. PCC 7942

**Javier Espinosa, Karim Laichoubi, Miguel Ángel Castells, y Asunción Contreras**  
*Universidad de Alicante, Dpto. Fisiología, Genética y Microbiología*

Las cianobacterias son organismos fotosintéticos que poseen sofisticados mecanismos para adaptar su metabolismo a las variaciones que ocurren en el medio que las rodea. Dos reguladores clave del control por nitrógeno en cianobacterias son el regulador transcripcional NtcA y la proteína transductora de señales P<sub>II</sub>, una de las más conservadas en transducción de señales. La proteína PipX (P<sub>II</sub> Interacting Protein X), identificada mediante el sistema del doble híbrido de levaduras y que está, al igual que NtcA, muy conservada y presente sólo en cianobacterias, interacciona tanto con P<sub>II</sub> como con NtcA.

PipX participa en la inducción de los genes dependientes de NtcA que hemos analizado, resultados que sugieren el papel coactivador de PipX. Hasta ahora ninguno de los procesos relacionados con PII que hemos estudiado, está regulado por PipX. Una alternativa posible, es que PII tenga un papel en la modulación de la interacción de PipX con NtcA. Para tratar de entender la función del complejo PII-PipX, estamos caracterizando la expresión de *pipX* y los niveles de proteína *in vivo* en distintas condiciones y fondos genéticos. Hemos identificado un sitio único de inicio de la transcripción de *pipX*, el cual no varía con la disponibilidad de nitrógeno. Para abordar el estudio de la regulación de la expresión de *pipX*, estamos empleando una fusión transcripcional del promotor de *pipX* a genes *luxAB* y ensayos de RT-PCR. Por otra parte, a nivel de proteína estamos estudiando si NtcA o PII tienen algún efecto sobre los niveles intracelulares de proteína PipX.

- 1) Espinosa, J., K. Forchhammer, S. Burillo, and A. Contreras. 2006. Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Mol Microbiol* 61:457-69.
- 2) Espinosa, J., K. Forchhammer, and A. Contreras. 2007. Role of the *Synechococcus* PCC 7942 nitrogen regulator protein PipX in NtcA-controlled processes. *Microbiology* 153:711-8.
- 3) Forchhammer, K. 2008. P(II) signal transducers: novel functional and structural insights. *Trends Microbiol* 16:65-72.

## REGULACIÓN DE LA ASIMILACIÓN DE NITRATO EN LA CIANOBACTERIA FILAMENTOSA FORMADORA DE HETEROCISTOS *Anabaena* sp. PCC 7120

Frías, J.E; Herrero, A; Flores, E.

*Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad de Sevilla, Sevilla*

Las cianobacterias son organismos procariotas capaces de realizar una fotosíntesis oxigénica similar a la de las plantas superiores. Estos organismos asimilan diversas fuentes de N, entre ellas el nitrato, nitrito, amonio, aminoácidos, urea e, incluso, algunos son capaces de fijar N atmosférico (en el caso de *Anabaena* sp. PCC 7120, en unas células especializadas denominadas heterocistos).

La asimilación de nitrato implica tres pasos sucesivos: el transporte a través de la membrana, su reducción intracelular hasta amonio por la acción secuencial de la nitrato reductasa y nitrito reductasa y la incorporación del amonio a esqueletos carbonados a través de la ruta GS-GOGAT. Los genes del sistema de transporte (*nrtABCD*), de la nitrito reductasa (*nirA*) y de la nitrato reductasa (*narB*) se encuentran agrupados en el genoma de *Anabaena* sp. PCC 7120 constituyendo un operón, el operón *nir*. En dicha cianobacteria la expresión a alto nivel del operón *nir* requiere la presencia de un inductor, nitrato o nitrito, además de la ausencia de amonio. Se han identificado varias proteínas de acción positiva sobre la expresión del operón *nir*. Mientras NtcA (familia CRP) y NtcB (familia LysR) ejercen su función uniéndose directamente al promotor del operón *nir*, CnaT (posiblemente una glicosil transferasa) actúa por un mecanismo aún desconocido. No obstante, ninguno de ellos parece mediar el efecto inductor del nitrato/nitrito en *Anabaena* sp. PCC 7120. En el genoma de esta cianobacteria existen 4 *orfs* (*all0603*, *all0604*, *all0605* y *all0606*) entre los genes *nirA* y *ntcB*. Los mutantes insercionales de *all0606*, *all0605* (*nirB*) y *all0604* son capaces de crecer a expensas del nitrato. Al igual que ocurre en *Synechococcus* sp. PCC 7942, la proteína NirB se requiere para la expresión de altos niveles de actividad nitrito reductasa. Sin embargo, también se requiere para mantener bajos niveles de expresión del operón *nir* en ausencia de inductor, aunque este efecto podría también implicar a la nitrito reductasa, NirA. El mutante por delección en *nirA* también presenta niveles anormalmente altos de expresión a nivel de mRNA del operón *nir* en ausencia de inductor. El análisis de mutantes dobles *nirB nrtB* y *nirA nrtB* descarta que dicho fenotipo se deba al efecto positivo de posibles trazas de inductor en medio sin N combinado añadido. Así pues, las proteínas NirA y/o NirB podrían mediar el efecto positivo del nitrato/nitrito sobre la expresión del operón *nir* en *Anabaena* sp. PCC 7120.



## **ALGUNOS AVANCES EN LOS TRANSPORTADORES DE NITRATO/NITRITO EN LEVADURAS**

**Yusé Martín, Francisco Navarro, Elisa Cabrera, Rafaela Gonzalez, Yelvis González, Celia Rodríguez, Braulio Medina, Ana Lancha y José M. Siverio.**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública. Universidad de La Laguna. jsiverio@ull.es*

En los últimos años hemos centrado nuestro trabajo en el principal transportador de nitrato de alta afinidad (Ynt1) en la levadura *Hansenula polymorpha*. Los niveles de Ynt1 se regulan mediante ubiquitinación, fosforilación, endocitosis y degradación vacuolar. También hemos encontrado una kinasa de proteínas del tipo Npr1 que media en los procesos de fosforilación y ubiquitinación de Ynt1 en función de la fuente de nitrógeno. Nuevos transportadores que regulan mediante excreción el nitrato y nitrito intracelular han sido estudiados.

## EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN *Haloferax mediterranei* ASOCIADA A LA FUENTE DE NITRÓGENO

**Bravo-Barrales, G.; Pedro-Roig, L.; Camacho, M.; Pire, C.; Díaz, S. y Bonete, M.J.**  
*Departamento de Agroquímica y Bioquímica. División de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Campus de San Vicente del Raspeig. Carretera de San Vicente del Raspeig s/n. Alicante C.P. 03690*

*Haloferax mediterranei* es capaz de crecer en un medio mínimo utilizando glucosa como única fuente de carbono y nitrato como única fuente de nitrógeno. En condiciones aeróbicas, el nitrato es incorporado al metabolismo de la célula por la vía asimilativa, mediante las enzimas nitrato y nitrito reductasas asimilativas (1). Se conoce también, que el nitrato actúa como un inductor de la expresión de las enzimas asimilativas mientras que la expresión de dichas enzimas queda inhibida en presencia de amonio (2,3). Antecedentes como los anteriores indican que, según la fuente de nitrógeno, *Hfx. mediterranei* presentaría un patrón de expresión de proteínas particular y característico.

Para tener una aproximación de cómo afecta una determinada fuente de nitrógeno en la expresión de proteínas en *Hfx. mediterranei*, se realizaron cultivos del microorganismo en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono y nitrato o amonio como fuentes de nitrógeno. Con el objetivo de analizar si alguna de las proteínas de dicha ruta presenta expresión constitutiva, además se llevó a cabo un cultivo en medio máximo. En todo los casos las condiciones de cultivo fueron: temperatura 42°C, pH 7,5 y agitación de 150 rpm. Cuando los cultivos se encontraban en su fase exponencial de crecimiento, se recogieron muestras para la extracción de proteínas. El método empleado para la extracción se basó en uno desarrollado para *Haloferax volcanii* (4), adaptado en este caso para *Hfx. mediterranei*.

Una vez extraídas las proteínas en forma de "pellet", éste fue resuspendido en una solución de rehidratación con anfólitos para el rango de pH 4 -7. Tras la rehidratación de las muestras se continuó con la electroforesis bidimensional, de acuerdo al protocolo de Invitrogen (5,6), etapa en la que, para el isoelectroenfoco se usó un rango de pH de 4 -7 y para la electroforesis en gel de poliacrilamida se utilizaron geles de Tris-glicina con gradiente 4-20%. Finalizada la electroforesis bidimensional los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie.

Al disponer de las imágenes de los geles correspondientes a los tres tipos de medios de cultivo, se analizaron con el software Melanie y se pudo observar la presencia particular de ciertos "spots" según el medio que caracteriza cada cultivo, así como diferencias de intensidades de ciertos "spots" entre la imagen de un gel y otro. Estas observaciones demuestran la capacidad de *Hfx. mediterranei* de disponer de un metabolismo de respuesta particular y característico definido por un conjunto de proteínas cuyo nivel de expresión se vincula a la fuente de nitrógeno disponible y a las condiciones del medio que se presentan asociadas a estas fuentes de nitrógeno.

Futuros estudios fisiológicos, así como la identificación detallada de proteínas permitirán conocer con más certeza el efecto de diversos factores físico-químicos en la expresión y regulación de la vía asimilativa en *Hfx. mediterranei*.

### Bibliografía:

- (1) Martínez-Espinosa, y col. (2001) FEMS Microbiol. 196:113-118
- (2) Lledo y col. (2005) Gene 361:80-88
- (3) Martínez-Espinosa y col. (2007) Extremophiles. 11(6):759-767
- (4) Aaron y col., (2006). Anal Bioch. 351:254-259
- (5) Invitrogen (2004), Zoom IPGRunner System for isoelectric focusing of ZOOM strips.
- (6) Invitrogen (2003), Novex Pre-Cast Gel Electrophoresis Guide.

Trabajo financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO200508991C0201).

## ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS ASOCIADOS AL DESARROLLO DE LA HOJA EN PLANTAS DE GIRASOL CRECIDAS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE NITRATO.

**Eloísa Agüera, Purificación Cabello y Purificación de la Haba.**

*Dpto. Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. Área de Fisiología Vegetal. Universidad de Córdoba. 14071. Córdoba. España.*

Se han determinado diferentes parámetros que varían a lo largo del desarrollo de la hoja en plantas de girasol. Para ello, las plantas de girasol se cultivaron con diferentes concentraciones de nitrato (2 mM y 20 mM) durante un periodo máximo de 42 días, y se recolectó el primer par de hojas a los 16, 22, 36, y 42 días. En las hojas se determinaron los parámetros de crecimiento, velocidad de fotosíntesis y se analizaron el contenido en pigmentos, carbohidratos solubles, almidón y aminoácidos.

Se observó que las plantas crecidas con 20 mM de  $\text{NO}_3^-$  (N+) presentaban un 37 % más de materia seca y un 44% más de superficie foliar que las plantas crecidas con 2 mM de  $\text{NO}_3^-$  (N-). También se comprobó que el grado de desarrollo de la hoja afectó negativamente al contenido de pigmentos fotosintéticos, de forma que el contenido de clorofila total alcanzó el valor máximo a los 22 días en las plantas N+ y disminuyó a partir de ese momento con la edad de la hoja, mientras que en las plantas N- el contenido en pigmentos disminuyó progresivamente a lo largo de todo el desarrollo de la hoja. La edad de la hoja también influyó negativamente sobre la velocidad de fotosíntesis, presentando una mayor pérdida de actividad fotosintética las plantas N-. Con respecto al contenido en carbohidratos, se pudo comprobar como en ambos tratamientos (N+ y N-) las concentraciones de azúcares solubles incrementaron con la edad de la hoja, mientras que el contenido en almidón disminuyó.

También se observó un considerable descenso tanto en el contenido de aminoácidos como en  $\text{NH}_4^+$ , asociado al grado de desarrollo de la hoja. Este descenso fue mayor en plantas crecidas con baja concentración de  $\text{NO}_3^-$  (N-), de forma que mientras la concentración de glutamato y aspartato descendió un 80 % a los 42 días en las plantas N-, se mantuvo próxima al 50 % en las plantas N+. Por tanto, la relación glutamato + aspartato/glutamina + asparragina descendió mucho más bruscamente en las plantas N-, lo que podría reflejar la mayor incapacidad de formar aminoácidos ricos en N en hojas senescentes en plantas crecidas con baja concentración de nitrato (1).

Estos resultados sugieren que el déficit de N en la planta puede inducir la senescencia temprana de la hoja y acortar, por tanto, el ciclo de desarrollo de la misma. Esta senescencia temprana podría ser consecuencia de un déficit en aminoácidos u otros metabolitos asociados con el metabolismo de N lo que podría actuar como señal inductora del proceso de senescencia.

### Bibliografía

- 1) Tercé-Laforgue T, Mäck G, Hirel B (2004). New insights towards the function of glutamate dehydrogenase revealed during source-sink transition of tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants grown under different nitrogen regimes. *Physiol. Plant* 120: 220-228

Investigación financiada por la Junta de Andalucía (Proyecto de excelencia P07-CVI-02627, Grupo de Investigación: CVI-0159) y DGICYT (BIO2006-09366)

## GENES *Nar1* Y ADAPTACIÓN METABÓLICA EN *Chlamydomonas*

Higuera-Sobrino J, Philips G<sup>1</sup>, Hemschemeier<sup>1</sup> A, Happe<sup>1</sup> T, Fernández E, Galván A.

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba. Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, Planta Baja, 14071 Córdoba (España).*<sup>1</sup>*Dept. Biología y Bioquímica de plantas AG fotobiotechnología. Univ. de Ruhr, 44780 Bochum (Alemania)*

*Chlamydomonas reinhardtii* es un alga unicelular eucariota fotosintético que comparte muchas características con plantas como es la organización estructural de un aparato fotosintético en un único orgánulo como es el cloroplasto. Sin embargo, también puede presentar un metabolismo fermentativo, característica muy poco frecuente en plantas o eucariotas. En efecto, *Chlamydomonas* tiene la capacidad de crecer heterotróficamente en oscuridad por la metabolización de acetato como fuente de carbono. Por el contrario, las plantas vasculares o bien no sobreviven o bien exhiben un crecimiento retardado y pérdida de pigmentación en ausencia de fotosíntesis.

El metabolismo fermentativo en *Chlamydomonas* utiliza rutas que son típicas de microorganismos anaeróbicos estrictos. Así, en oscuridad y anaerobiosis, tiene lugar una fermentación acoplada a la degradación de reservas de almidón con la producción de productos como formiato, acetato y etanol como los principales productos fermentativos y en menor proporción H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (1,2, 3). La formación de estos productos de fermentación está principalmente controlada a nivel de piruvato y la proporción de cada uno de estos productos puede variar según las condiciones de cultivo. La liberación del genoma de *Chlamydomonas* ha permitido la identificación los genes que codifican para la mayoría de las enzimas que participan en este metabolismo fermentativo. Además, estudios de microarrays han analizado la expresión de genes en respuesta a la aclimatación a condiciones de hipoxia (3.4).

Si bien las enzimas que producen formiato, CO<sub>2</sub> y acetato están identificadas, las proteínas responsables de su transporte y excreción al medio se desconocen. En este sentido, nosotros proponemos que la familia de transportadores NAR1 de *Chlamydomonas* podría tener un papel.

*Nar1* es una familia multigénica en *chlamydomonas* formada por seis genes y las proteínas NAR1 son miembros de los denominados Formate/Nitrite transporters (FNT) (5). Este tipo de transportadores está presente en levaduras, algas, hongos, protozoos pero no así en plantas. En este trabajo se ha estudiado la expresión de los transportadores NAR1 de *Chlamydomonas* en condiciones de metabolismo fermentativo con el objeto de proponer nuevas funciones para algunos de los miembros de esta familia.

1. Gfeller, R. P., and Gibbs, M. (1984) *Plant Physiol* **75**(1), 212-218
2. Kreuzberg, K. (1984) *Physiol Plantarum* **61**, 87-94
3. Atteia, A., van Lis, R., Gelius-Dietrich, G., Adrait, A., Garin, J., Joyard, J., Rolland, N., and Martin, W. (2006) *J Biol Chem* **281**(15), 9909-9918
4. Hemschemeier, A., and Happe, T. (2005) *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 1), 39-41
5. V. Mariscal, P. Moulin, M. Orsel, A.J. Miller, E. Fernandez and A. Galvan. (2006) *Protist* **157**,421-433.

Este trabajo ha sido financiado por MEC (BFU-2005-07521) y MEC (HA 2006-0064 Acción integrada)

## LAS PROTEÍNAS DE *Chlamydomonas* CNX1G, CNX1E Y SUS QUIMERAS RECONSTRUYEN LA BIOSÍNTESIS DE COFACTOR DE MOLIBDENO EN PROCARIOTAS

Ángel Llamas, Manuel Tejada-Jiménez, Aurora Galván, Emilio Fernández

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba. Campus Universitario de Rabanales, Edif. Severo Ochoa, planta baja. 14071 Córdoba. España*

A excepción de la nitrogenasa bacteriana, el resto de las más de 40 molibdoenzimas descritas tienen al Cofactor de Molibdeno (Cofactor de Mo) como la forma funcional del Mo. Entre las molibdoenzimas destacan: la Nitrato Reductasa (NR), Aldehído Oxidasa y Sulfito Oxidasa. La biosíntesis de Cofactor de Mo está ampliamente conservada, siendo la última etapa la inserción del Mo a la molibdopterina (MPT). En procariotas, este paso está catalizado por las proteínas MogA y MoeA, mientras que en eucariotas estas dos proteínas se han fusionado dando una proteína multifuncional con dominios G y E denominada CNX1. Sorprendentemente, a pesar de ser *Chlamydomonas* un organismo eucariota, presenta los dominios G y E de CNX1 separados en dos proteínas, que hemos denominado CrCNX1G y CrCNX1E. El análisis filogenético agrupa CrCNX1G con sus homólogos procariotas mientras que CrCNX1E agrupa con sus homólogos eucariotas. Tras el aislamiento de DNA genómico y de cDNA de ambos genes, hemos construido dos proteínas quiméricas mediante la fusión de CrCNX1G y CrCNX1E en las dos orientaciones posibles (CrCNX1GE y CrCNX1EG). Mediante el escrutinio de la mutateca insercional de *Chlamydomonas* se han identificado estirpes mutantes en *CrCnx1G* y *CrCnx1E* y por cruce genético se ha aislado el doble mutante en ambos genes. La transformación de estas estirpes con los DNA genómicos aislados repara el crecimiento en nitrato de los mutantes. Hemos expresado las 4 proteínas marcadas con 6xHis-tag en *E. coli* obteniendo una alta expresión y grado de purificación. La expresión de CrCNX1G, CrCNX1E, CrCNX1GE y CrCNX1EG en los mutantes de *E. coli* en *MoeA* y *MogA* complementa la actividad NR, siendo ésta la primera vez que una proteína CNX1E eucariota complementa la mutación *MoeA* procariota.

Financiado por MEC (BFU2005-07521)

## TRANSPORTE DE MOLIBDATO EN *Chlamydomonas*

**Manuel Tejada-Jiménez, Ángel Llamas Azúa, Emanuel Sanz-Luque, Aurora Galván Cejudo y Emilio Fernández Reyes**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba, Edif. Severo Ochoa, planta baja. 14071, Córdoba.*

El molibdeno participa, en forma de cofactor de molibdopterina, en el sitio activo de enzimas clave en el metabolismo del nitrógeno, azufre y carbono, como son la nitrato reductasa, sulfito oxidasa o xantina deshidrogenasa. Esto hace del molibdeno un elemento esencial para la mayoría de los organismos.

La forma en que los seres vivos toman molibdeno es mediante el transporte hacia el interior celular del oxoanión molibdato. Las bacterias toman molibdato a través de un sistema de transporte de tipo ABC (ATP-Binding-Cassete) bien conocido. En eucariotas este proceso solo se ha conocido reciente tras la identificación del primer transportador de molibdato en el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* (1). Dicho transportador está codificado por el gen *MoT1*, que pertenece a la familia MFS (Mayor Facilitator Superfamily) y está estructuralmente relacionado con los transportadores de sulfato SULTR. MOT1 muestra motivos específicamente conservados con proteínas de plantas, algas, hongos y bacterias. El estudio de la funcionalidad de MOT1 reveló una  $K_m$  de alrededor de 6 nM y una inducción de su expresión y su actividad en presencia de nitrato como fuente de nitrógeno. Estos hallazgos agrupan a MOT1 entre los transportadores descritos hasta la fecha con más afinidad hacia su sustrato; y muestran una estrecha coordinación entre la biosíntesis de cofactor de molibdeno y la ruta de asimilación de nitrato.

Estudios preliminares apuntan a que el transporte de molibdato en *Chlamydomonas* depende de la presencia de la proteína CNX1E implicada en la inserción del molibdeno en la molécula de molibdopterina; ya que estirpes que carecen de esta proteína presentan deficiencia en el transporte de molibdato.

Financiado por MEC (BFU2005-07521)

### Bibliografía

- 1) Tejada-Jiménez M, Llamas A, Sanz-Luque E, Galván A, Fernández E. A high-affinity molybdate transporter in eukaryotes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Dec 11;104(50):20126-30

## EXPRESION HOMOLOGA EN *Haloferax volcanii* DE UNA NITRITO REDUCTASA DE *Haloferax mediterranei* .

**Basilio Zafrilla, Rosa M. Martínez-Espinosa, Vanesa Bautista, Julia Esclapez, María José Bonete**

*Universidad de Alicante. División de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Alicante, Spain*

La haloarquea *Hfx. mediterranei* ha demostrado ser capaz de crecer en medios con fuentes limitadas de nitrógeno. Nitrato, nitrito y amonio pueden ser asimilados por este microorganismo mediante la vía asimilativa del nitrógeno recientemente descubierta en nuestro laboratorio. La enzima nitrito reductasa asimilativa (NiR) es la encargada de llevar a cabo la reducción de nitrito a amonio en presencia de un donador de electrones. Esta enzima ha sido caracterizada en nuestro laboratorio como un monómero de 65.5 Kd que incorpora en su estructura un grupo sirohemo y un cluster 4Fe-4S coordinado por cisteínas [1].

El operón que codifica para la asimilación de nitrato en esta arquea ha sido secuenciado. Se han identificado cuatro marcos de lectura que por homología codifican para las enzimas nitrato y nitrito reductasas, así como para un transportador de nitrato y una enzima que interviene la síntesis de cofactores de molibdeno [2].

En este trabajo se detalla la amplificación y clonaje del gen *nir* así como su introducción en un vector diseñado para la obtención de proteína en organismos halofílicos y su posterior expresión en *Haloferax volcanii*

[1] Rosa M. Martínez-Espinosa, Frutos C. Marhuenda-Egea, María José Bonete (2001). Purification and characterization of a possible assimilatory nitrite reductase from the halophile archaeon *Haloferax mediterranei*. FEMS Microbiol Lett. **196(2)**: 113-118.

[2] Belén Lledó, Frutos C. Marhuenda-Egea, Rosa María Martínez-Espinosa and María José Bonete (2005) Identification and transcriptional analysis of nitrate assimilation genes in the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. Gene **361**: 80-88.

[3] F. Pfeifer, S. Offner, K. Krueger, P. Ghahraman, C. Englert (1994) Transformation of halophilic Archaea and investigation of gas vesicle synthesis. System Appl Microbiol. **16**,569-567.

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos BIO2005-08991-C02-01 del programa de Biotecnología del MEC y GRUPOS04/72 de la Generalitat Valenciana.

## RESÚMENES DE LA SESIÓN N2

Transporte y asimilación de  
amonio, aminoácidos y ureidos



## REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE PINO

**Concepción Ávila, Marina Rueda, Remedios Crespillo y Francisco M. Cánovas**

*Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n 29071-Málaga*

La regulación de la transcripción representa uno de los puntos de control clave de la expresión génica en plantas ya que va a ser responsable de la actividad tejido-dependiente y estadio de desarrollo-dependiente de muchos genes. Durante el proceso de diferenciación y desarrollo las plantas necesitan integrar todo un conjunto de señales para regular patrones de expresión complejos.

La incorporación de nitrógeno inorgánico en forma de amonio a esqueletos carbonados es uno de los procesos bioquímicos más importantes llevados a cabo por los vegetales, especialmente porque la disponibilidad de nitrógeno en el suelo suele ser un factor limitante tanto del crecimiento como del desarrollo de las plantas, principalmente de los árboles. A diferencia de lo que ocurre en angiospermas, en las coníferas la asimilación de amonio se lleva a cabo mediante la acción catalítica de glutamina sintetasa citosólica (GS1), estando ausente la enzima cloroplastídica. En nuestro grupo se han clonado y caracterizado dos isogenes de GS1: *GS1a* y *GS1b* que presentan patrones de expresión diferentes.

La glutamina sintetasa citosólica es un claro ejemplo de familia génica en el que la funcionalidad de sus miembros ha sido difícil de establecer debido a la similitud existente entre ellos y a la redundancia de dos o más miembros, presentes en ocasiones de forma simultánea en el mismo tejido o tipo celular. En el caso de pino la existencia sólo de formas citosólicas hacen de esta especie un modelo único respecto a las angiospermas para el estudio del metabolismo nitrogenado. Por ello y por el hecho de estudiar uno de los procesos centrales del metabolismo vegetal en una especie de interés forestal resulta de gran interés el estudio de la regulación diferencial de los isogenes de GS en plantas de pino. Ambos genes parecen derivar de un gen ancestral común. Sin embargo, sus secuencias promotoras no presentan homologías significativas, es más, los posibles elementos cis existentes en ambos promotores indican que su regulación es diferente. Se discutirá la implicación de distintos factores de transcripción en el control de la asimilación de amonio en árboles.

## CARACTERIZACIÓN, REGULACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA GLUTAMATO DESHIDROGENASA DE *Prochlorococcus* MIT9313

Oriol Alberto Rangel Zúñiga, Guadalupe Gómez-Baena, Antonio López-Lozano, José Manuel García-Fernández y Jesús Diez Dapena

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Severo Ochoa, 1ª Planta. Campus de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba. bb2razuo@uco.es.*

La cianobacteria marina *Prochlorococcus* se ha descrito como el organismo procariota fotosintético más abundante del océano y presumiblemente de la tierra (1). Responsable de una fracción importante de la producción primaria del océano, tiene un tamaño que oscila de 0,5 a 0,7  $\mu\text{m}$  perfilándolo como el organismo más pequeño conocido. Además posee un especial aparato fotosintético compuesto, entre otros, por derivados divinilo de la clorofila a y b. Coloniza desde la superficie hasta los 200 metros de profundidad donde la disponibilidad de luz es aproximadamente el 1% de la de superficie. En función de ello las diferentes estirpes de *Prochlorococcus* se han agrupado en estirpes de superficie y estirpes de profundidad. Se distribuye en zonas intertropicales de los océanos del planeta y coloniza principalmente áreas extremadamente oligotróficas.

Dentro de los nutrientes más escasos en dichas zonas encontramos el nitrógeno, el cual es un elemento determinante para la producción primaria ya que se considera, junto con el hierro, elemento limitante de la misma en los océanos del mundo. Existen diferentes fuentes de nitrógeno que pueden ser utilizadas por las cianobacterias, tales como: nitrógeno molecular, nitrato, nitrito, amonio y fuentes orgánicas como: cianato, urea y aminoácidos.

Todas ellas son asimiladas principalmente por la vía de la glutamina sintetasa y glutamato sintasa (GS/GOGAT) (1). *Prochlorococcus* utiliza como principal fuente de nitrógeno el amonio que es asimilado también vía GS/GOGAT (2). Sin embargo, existe una posible ruta alternativa constituida por la glutamato deshidrogenasa (GDH). La GDH cataliza la reacción reversible entre el amonio y el 2-oxoglutarato para formar L-glutamato, utilizando como cofactores piridin nucleótidos (3).

De acuerdo a la información disponible de los genomas de *Prochlorococcus* secuenciados hasta el momento, solo las estirpes MIT9313, MIT9303 (ambas estirpes de profundidad), MIT9215 y MIT9515 (ambas de superficie), poseen el gen *gdhA* el cual codifica para la glutamato deshidrogenasa.

Nuestro objetivo fue determinar la función de la glutamato deshidrogenasa, en el metabolismo del nitrógeno, en *Prochlorococcus* MIT9313 y contribuir al conocimiento de las claves del éxito ecológico de este organismo. Para ello se estudio el efecto que tienen diversas condiciones como: ausencia de nutrientes, inhibición de GS, inhibición de GOGAT, envejecimiento, inhibición de la cadena de transporte de electrones fotosintética y cultivo en presencia de aminoácidos sobre la actividad y cantidad de proteína GDH, así como sobre la expresión del gen *gdhA* en *Prochlorococcus* MIT9313. Nuestros resultados sugieren que la GDH de la estirpe MIT9313 podría participar como soporte de la GS en la asimilación de amonio bajo condiciones de envejecimiento y que en presencia de glutamato como fuente nitrógeno podría cumplir una función importante en el catabolismo de aminoácidos.

1) Muro-Pastor, MI y Florencio, FJ. 2003. Regulation of ammonium assimilation in cyanobacteria. *Plant Physiol Biochem.* 41:395-603.

2) El Alaoui, S., *et al.* 2003. Glutamine synthetase from the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* spp.: characterization, phylogeny and response to nutrient limitation. *Environ Microbiol.* 5:412-423.

3) Florencio, FJ., *et al.* 1987. Identification and characterization of a glutamate dehydrogenase in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *FEBS Letters.* 223:37-41.

*Financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (MEC, BFU206-10011/BMC), la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia P07-CVI-3055) y la Universidad de Córdoba (Programa Propio de Investigación). O.AR.Z., G.G.B y A.L.L recibieron becas de la Universidad de Córdoba, Junta de Andalucía y MEC, respectivamente.*

## EFECTOS DE LA DEFICIENCIA EN BORO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA ASPARRAGINA SINTETASA EN PLANTAS DE TABACO. REGULACIÓN POR LA FUENTE DE NITRÓGENO Y LOS NIVELES DE CARBOHIDRATOS

Rexach J<sup>(1)</sup>, Beato VM<sup>(1)</sup>, Navarro-Gochicoa MT<sup>(1)</sup>, Camacho-Cristóbal JJ<sup>(1)</sup>, Herrera-Rodríguez MB<sup>(1)</sup>, Maldonado JM<sup>(2)</sup>, González-Fontes A<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> Departamento de Fisiología, Anatomía y Biología Celular, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad Pablo de Olavide, E-41013 Sevilla, España

<sup>(2)</sup> Departamento de Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, E-41012 Sevilla, España

### Abstract

El boro (B) es un micronutriente esencial que se requiere para el normal desarrollo de las plantas vasculares. Así, es necesario para la estructura y funcionamiento de la pared celular y de las membranas celulares, además de estar implicado en otros procesos fisiológicos<sup>1</sup>.

En las plantas, la asparragina se sintetiza tanto a partir del nitrógeno asimilado como del almacenado en las semillas y las hojas<sup>2</sup>. La principal reacción para la síntesis de este aminoácido implica la transferencia del grupo amido de la glutamina al aspartato siendo catalizada por la enzima asparragina sintetasa (AS) dependiente de glutamina. También ha sido propuesto que esta enzima puede usar amonio directamente como sustrato (sobre todo si la concentración de este catión es elevada) y aspartato para generar asparragina, si bien esta reacción no ha sido claramente demostrada in vivo<sup>3</sup>. La alta relación N/C de la asparragina convierte a este aminoácido en un transportador económico de nitrógeno reducido, especialmente útil durante la noche y en condiciones de carbono limitante<sup>3</sup>. De hecho, la relación N/C es el principal factor que regula la expresión de los genes de AS en las plantas vasculares<sup>3,4</sup>.

Recientemente se ha descrito en plantas de tabaco sometidas a deficiencia de B un aumento en el contenido radical de asparragina, el cual podría deberse bien a una degradación de proteínas o a un incremento en la síntesis de este aminoácido<sup>5</sup>.

Por tanto, el objetivo de este trabajo ha sido estudiar en plantas de tabaco cómo se afecta la expresión del gen que codifica la AS bajo condiciones de deficiencia de B, así como su regulación transcripcional por la fuente de nitrógeno y por los niveles de carbohidratos.

En los vástagos, los resultados obtenidos mostraron una correlación entre la expresión del gen de la AS y los niveles de asparragina tanto en plantas tratadas (2 µM) como sometidas a deficiencia de B. Además, en las raíces de plantas sometidas a deficiencia de B, se observó un aumento del contenido asparragina, el cual se correspondió con un incremento de la expresión del gen de la AS.

Asimismo, este gen parece estar regulado a nivel transcripcional tanto por amonio como por los niveles de carbohidratos solubles. Así, se observó tanto en vástagos como en raíces, e independientemente del tratamiento de B, que cuanto más alto era el contenido de amonio mayor era la inducción de la expresión del gen de la AS. Además, en raíces y en vástagos, el aumento de los niveles endógenos de los carbohidratos solubles originó una disminución de los niveles de transcritos de AS tanto en las plantas cultivadas en presencia como en ausencia de B. La sobreexpresión en raíces del gen AS observada en condiciones de deficiencia de B podría estar mediada por la disminución del contenido radical de carbohidratos solubles medidos en estas condiciones.

En resumen, el amonio y los niveles de carbohidratos solubles regulan la expresión del gen de la AS. Además, estos resultados sugieren que la AS podría desempeñar un papel como enzima detoxificante de amonio en situaciones de estrés ambiental causadas por la deficiencia en boro.

Investigación subvencionada por la Dirección General de Investigación (M. E. C.: BFU2006-05304) y la Junta de Andalucía (BIO-266), España.

### Bibliografía

- 1) Blevins DG, Lukaszewski KM (1998) Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49: 481-500.
- 2) Sieciechowicz KA, Joy KW, Ireland RJ (1988) Phytochem. 27: 663-671.
- 3) Lea PJ, Sodek L, Parry MAJ, Shewry PR, Halford NG (2007) Ann. Appl. Biol. 150: 1-26.
- 4) Herrera-Rodríguez MB, Maldonado JM, Pérez-Vicente R (2004) Plant Physiol. Biochem. 42: 511-518.
- 5) Camacho-Cristóbal JJ, González-Fontes A (2007) Planta 226: 443-451.

## EXPRESIÓN HETERÓLOGA Y MUTAGÉNESIS DE ASPARRAGINASA K<sup>+</sup>-DEPENDIENTE DE *Lotus japonicus*

Alfredo Credali<sup>1</sup>, Jillian Perry<sup>2</sup>, Martin Parniske<sup>4</sup>, Trevor Wang<sup>3</sup> y Antonio J. Márquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpt. Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González, 1; 41071-Sevilla; <sup>2</sup>The Sainsbury Laboratory and <sup>3</sup>John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH (UK); <sup>4</sup>Department of Biology, Ludwig-Maximilian-Universität, D-80638 Munich (Germany).

En plantas, la asparragina es una de las formas más comunes de almacenar y transportar nitrógeno. La L-Asparraginasa (EC 3.5.1.1.) es la enzima que cataliza la hidrólisis del grupo amídico de la L-Asparragina liberando L-aspartato y amonio que puede ser utilizado luego para la síntesis de otras proteínas y compuestos nitrogenados. Existen dos grandes familias de asparraginasas: asparraginasa tipo bacteriano y asparraginasa de plantas. Las asparraginasas de plantas pertenecen a la superfamilia de las amidohidrolasas nucleófilas N-terminales. Estas enzimas son heterotetrámeros compuestos por dos subunidades diferentes formadas por un corte autoproteolítico. Este corte posibilita la conformación en el sitio activo de la extremidad nucleófila N-terminal (1,2). En plantas se han descrito a su vez asparraginasas K<sup>+</sup>-dependientes y K<sup>+</sup>-independientes (3).

En *L. japonicus* se ha detectado la existencia de 3 secuencias codificantes para asparraginasa. En este trabajo se ha amplificado y clonado la secuencia TM0321.16 (LjTC8339), que muestra un 83% de identidad con la asparraginasa K<sup>+</sup> dependiente de *Arabidopsis thaliana* (At3g16150) y un 55% de identidad con la asparraginasa K<sup>+</sup> independiente de *Arabidopsis thaliana* (At5g08100). La expresión heteróloga de dicha secuencia en *E. coli* y caracterización de la correspondiente proteína recombinante purificada confirma la estricta dependencia de K<sup>+</sup> de esta asparraginasa. Ha sido también observado un corte autoproteolítico del precursor expresado en *E. coli*, examinándose dicho sitio de corte mediante técnicas proteómicas.

Paralelamente, se ha puesto en marcha un proyecto de búsqueda de mutantes de asparraginasa (asn-se2) de *L. japonicus* haciendo uso de la técnica de TILLING (target induced local lesions in genome) (4). Ha sido factible identificar 4 líneas mutantes que están actualmente en proceso de análisis fenotípico. A su vez, mediante la técnica de mutagénesis dirigida se está abordando el análisis funcional en la enzima recombinante de las mutaciones encontradas por TILLING.

### Referencias

1. Borek and Jaskólski (2001) Acta Biochimica Polonica 48: 893-902.
2. Borek et al. (2004) Eur. J. Biochem. 271: 3215-3226.
3. Bruneau et al. (2006) Planta 224: 668-67924.
4. Perry et al. (2003) Plant Physiol. 131: 866-871.

**Agradecimiento:** Unión Europea (Proyecto INTEGRAL MRTN-CT-2003-505227)

## **EL SISTEMA GÉNICO *hpx* DE *Klebsiella pneumoniae*, IMPLICADO EN LA UTILIZACIÓN DE HIPOXANTINA COMO FUENTE DE NITRÓGENO, ESTÁ SOMETIDO A UNA DOBLE REGULACIÓN: POR NIVELES DE NITRÓGENO Y POR PRESENCIA DE PURINAS.**

**Autores:** L. de la Riva, N. Murtra, J. Badía, J. Aguilar, R.A. Bender, L. Baldomà.

*Centro:* Departament de Bioquímica i Biologia Molecular-Farmacia. *Facultat de Farmacia.* *Universitat de Barcelona.* *Direcció:* Avda. Joan XXIII s/n. 08028 Barcelona.

*Klebsiella pneumoniae* es una bacteria habitual de nuestra flora intestinal, aunque existen cepas que pueden ser patógenos oportunistas implicados en el desarrollo de diversas patologías como la neumonía. En estos casos, la competencia por el hábitat con el resto de especies microbianas que cohabitan en el huésped es fundamental para que los patógenos puedan desarrollar su nicho ecológico. En este sentido, la versatilidad metabólica supone una ventaja en la competencia por el hábitat. Por ejemplo, aislados patógenos procedentes de abscesos hepáticos contienen el regulón *all*, un sistema génico implicado en la utilización de alantoína como fuente de nitrógeno. Los niveles de alantoína se encuentran elevados en pacientes con diabetes mellitus, enfermedad que supone un factor de riesgo para el desarrollo de abscesos hepáticos. *K. pneumoniae*, a diferencia de *E. coli*, puede asimilar todos los nitrógenos de las purinas en condiciones aeróbicas. A pesar de que las condiciones del tracto intestinal son anaeróbicas, la capacidad de utilizar aeróbicamente las purinas como fuentes de nitrógeno puede ser útil para las cepas patógenas a la hora de colonizar ambientes aeróbicos como las vías respiratorias. De hecho, la mucosa de las vías respiratorias superiores contiene ácido úrico, el cual desempeña una función antioxidante para combatir las especies reactivas del oxígeno generadas durante periodos de estrés oxidativo.

Estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación han permitido identificar el sistema génico *hpx* de *K. pneumoniae* implicado en la utilización de hipoxantina como fuente de nitrógeno en condiciones de nitrógeno limitantes. El sistema *hpx* se compone de cuatro unidades transcripcionales: *hpxDE* y *hpxR*, las cuales se transcriben divergentemente, y *hpxO* y *hpxPQT*, que se transcriben también de manera divergente. El operón *hpxDE* está implicado en la oxidación de hipoxantina a ácido úrico, ya que mutantes en cualquiera de sus genes no pueden utilizar hipoxantina como fuente de nitrógeno pero sí ácido úrico. Sin embargo, ni los productos génicos de los genes *hpxD* y *hpxE* se asemejan a las xantina deshidrogenasas descritas, ni ha sido posible determinar la actividad xantina deshidrogenasa a partir de los mismos. En base a la similitud de HpxD y HpxE con distintos componentes de la familia de las dioxigenasas, proponemos que estas proteínas constituyen una dioxigenasa formada por dos componentes, una oxidoreductasa (HpxE) y una oxigenasa (HpxD). De la misma manera, en base al fenotipo ácido úrico negativo/alantoína positivo de mutantes en el gen *hpxO*, concluimos que el producto génico del gen *hpxO* está implicado en la oxidación de ácido úrico a alantoína. Pero ni la proteína HpxO se parece a uricasas, ni ha sido posible determinar esta actividad enzimática a partir de tal proteína. Basándonos en el parecido de HpxO con monooxigenasas, postulamos que *hpxO* codifica una monooxigenasa dependiente de FAD. El gen *hpxP* codifica una permeasa de purinas. Se ha obtenido un mutante dirigido en dicho gen, el cual muestra el mismo fenotipo que la cepa parental en un medio con purinas como únicas fuentes de nitrógeno. Esto se debe a que en este mutante, otras permeasas de purinas están transportando estos compuestos y permitiendo, por tanto, el crecimiento con estas fuentes de nitrógeno. Los productos de los genes *hpxT* y *hpxQ* se asemejan a las enzimas implicadas en la transformación de los intermediarios de la oxidación de ácido úrico a alantoína. Por ello proponemos que las proteínas HpxT y HpxQ, junto a HpxO, son necesarias para llevar a cabo la oxidación de ácido úrico a alantoína. Por último, el gen *hpxR* codifica un regulador de la familia LysR. Siguiendo un patrón típico de reguladores de esta familia, la proteína HpxR actúa como activador del operón *hpxDE* y como represor de su propio gen.

El sistema *hpx* está sometido a una doble regulación, la llevada a cabo por el sistema global del nitrógeno y la llevada a cabo por la regulación específica de la vía. Mientras que los genes *hpxR* y *hpxO* se expresan de manera constitutiva, los operones *hpxDE* y *hpxPQT* son inducidos tanto por limitación de nitrógeno como por la presencia de los inductores hipoxantina (*hpxDE*) o ácido úrico (*hpxPQT*). La regulación por nitrógeno del operón *hpxPQT* tiene lugar a través del sistema NTR de *K. pneumoniae*, el cual se activa en condiciones de nitrógeno limitantes. El promotor *PhpxPQT* depende de la subunidad  $\sigma^{54}$  de la RNA polimerasa y es reconocido por los factores NtrC e IHF. El regulador que reconoce el ácido úrico como molécula inductora todavía no ha sido identificado. Sorprendentemente, la regulación por nitrógeno del operón *hpxDE* no tiene lugar a través del sistema NTR sino a través de un regulador que reprime la expresión de este operón en condiciones de exceso de nitrógeno. Esta es la primera vez que se describe una regulación de este tipo en *K. pneumoniae*. La regulación específica está llevada a cabo por el regulador HpxR, el cual reconoce a la hipoxantina como molécula inductora del operón *hpxDE*.

## METABOLISMO DE UREIDOS DURANTE EL DESARROLLO DE LA PLÁNTULA DE JUDÍA (*PHASEOLUS VULGARIS*)

**Francisco A. Quiles, Pedro Piedras y Manuel Pineda**

*Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. Grupo de Fisiología Molecular y Biotecnología de Plantas. Campus Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 1ª Planta. Universidad de Córdoba.*

### Abstract

La germinación y el desarrollo de la plántula son dos etapas del desarrollo importantes para la supervivencia de la planta, en las que los cotiledones presentan un metabolismo que genera nutrientes para ser transportados a los ejes en desarrollo. Los ureidos son compuestos orgánicos nitrogenados con una elevada relación N:C (1:1), y que tienen un papel fundamental como moléculas de transporte de nitrógeno desde los nódulos a las partes aéreas en las leguminosas ureídicas como por ejemplo judía y soja. El objetivo de este trabajo ha sido valorar el papel de los ureidos como moléculas de transporte de nitrógeno durante el desarrollo de la plántula de judía.

Se ha determinado ureidos en las semillas secas de judía (aproximadamente 1300 nmoles/par de cotiledones). Durante el proceso de germinación propiamente dicho, la cantidad total de ureidos disminuyó ligeramente, pero incrementó tanto en cotiledones como en ejes después de la emergencia radicular. A lo largo del desarrollo de la plántula, los ureidos se distribuyen homogéneamente en raíces, hipocotilos y epicotilos. El patrón de distribución de ureidos no se afectó por la presencia de nitrato o sacarosa en el medio hasta los 6 días tras la imbibición. La inclusión de alopurinol (inhibidor de la xantina deshidrogenasa) redujo los niveles de ureidos, lo que indica que estos provienen del metabolismo oxidativo de las purinas.

Se han determinado las actividades que catalizan la degradación de alantoína, alantoato y ureidoglicolato. Con la acción secuencial de las tres actividades se liberaría todo el nitrógeno contenido en los ureidos. Las tres actividades enzimáticas se inducen en ejes en desarrollo sugiriendo un papel importante de los ureidos en movilización de nitrógeno desde cotiledones hasta ejes. Sin embargo, ejes en ausencia de cotiledones también presentaron cierta capacidad de síntesis de ureidos. La acumulación de ureidos en cotiledones durante el desarrollo de la plántula se ha observado en judía y soja (ambas leguminosas ureídicas) y no se ha observado cambios importantes en cotiledones de otras leguminosas (garbanzo, guisante) u otras plantas (girasol, maíz). Esto sugiere que la diferenciación ureídica puede tener más importancia en el metabolismo vegetal que simplemente el transporte de nitrógeno fijado desde nódulos a las partes aéreas de las planta.

### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2006-09366), la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (CVI1761) y el Plan Andaluz de Investigación (CVI-115).

## IMPORTANCIA DE LAS RUTAS ANAPLERÓTICAS EN CONDICIONES DE NUTRICIÓN AMONIACAL EN *Arabidopsis thaliana*

Idoia Ariz<sup>1</sup>, Aquilino Lantero<sup>1</sup>, Ekhiñe Artola<sup>1</sup>, Saioa Cruchaga<sup>1</sup>, Carmen Lamsfus<sup>1</sup>, José Fernando Moran<sup>1</sup>, Jean Vidal<sup>2</sup> y Pedro María Aparicio-Tejo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Ciencias del Medio Natural. Universidad Pública de Navarra; 31006 Pamplona ( Navarra), España. idoia.ariz@unavarra.es

<sup>2</sup>Institut de Biotechnologie des Plantes (IBP) CNRS-Université Paris-Sud XI. Orsay. France.

Cuantitativamente el nitrógeno (N) es el elemento mineral más abundante de los tejidos vegetales, por lo que frecuentemente supone una limitación para la producción de los cultivos (1). Es el elemento que más se aporta como fertilizante y el que, también, se retira en mayor cantidad de los suelos agrícolas durante la cosecha (2). La fuente de N afecta a diversos procesos metabólicos de las plantas, entre los que se encuentra la incorporación del mismo a los compuestos orgánicos. Existen numerosos estudios en los que se muestra que, al compararlo con el de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), el suministro de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en pequeñas concentraciones tiene un efecto positivo en el desarrollo de las plantas, mientras que cuando es aplicado a altas dosis, es frecuente observar un efecto de toxicidad (3). Por otra parte, la disponibilidad de esqueletos carbonados es uno de los factores limitantes en la asimilación de N. En situaciones de alto requerimiento de esqueletos carbonados, como es la nutrición amoniacal, la relación C/ N puede verse alterada, así como la proporción y los contenidos de un gran número de moléculas. Así, en estas condiciones, cobran especial importancia la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), enzima central de una de las vías anapleróticas responsables de suministrar parte del C cuando el requerimiento del mismo es alto. Por ello hemos realizado un estudio con diferentes fuentes y dosis de N en dos líneas de *Arabidopsis thaliana*, una línea silvestre cv. Colombia (Col) y otra transgénica (R11) deficiente en PEPC foliar.

En nuestro estudio, las plantas fueron crecidas en cultivo hidropónico puro, con dos fuentes de N,  $\text{NO}_3^-$ , tratamiento control y  $\text{NH}_4^+$  tratamiento que provoca una situación de alto requerimiento de C. En  $\text{NH}_4^+$  las dosis aplicadas fueron 1 y 5 mM mientras que en  $\text{NO}_3^-$  se aplicó exclusivamente dosis de 5 mM. Las condiciones de crecimiento fueron: 16 h luz/ 8 h oscuridad, 20°C día/ 18°C noche, 65% HR y 250  $\mu\text{E}$  de intensidad luminosa. El objetivo de este experimento es, por una parte, comparar las diferentes nutriciones nitrogenadas en *Arabidopsis* y por otra, determinar la importancia de la función anaplerótica de la PEPC en condiciones de nutrición amoniacal y nítrica en la línea transgénica (R11) con respecto a la silvestre (Col).

Se midieron parámetros de biomasa (peso fresco), contenido en proteína en los diferentes tejidos, hoja y raíz, actividad y expresión para diferentes enzimas que intervienen en el metabolismo C/N en hoja y raíz: PEPC, isocitrato deshidrogenasa, glutamato deshidrogenasa, glutamina sintetasa. Además también se analizaron los contenidos de cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) y aniones ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ) inorgánicos. Los resultados obtenidos mostraron diferencias entre nutriciones nitrogenadas para todos los parámetros analizados. En cuanto a los resultados que obtuvimos para la línea transgénica, es destacable que no mostró diferencias de crecimiento (biomasa) con respecto a la línea silvestre para cada uno de los tratamientos aplicados.

### Referencias

- (1) Miller AJ and Cramer MD (2004). Root nitrogen acquisition and assimilation. Plant and Soil 274: 1-36
- (2) Lasa B (1998). Estudio medioambiental de la aplicación de lodos de depuradora en agrosistemas y su relación con la nutrición nitrogenada. Tesis doctoral. Universidad Pública de Navarra
- (3) Gerendás J, Zhu Z, Bendixen R, Ratcliffe R and Sattelmacher B (1997). Physiological and biochemical processes related to ammonium toxicity in higher plants. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde 160: 239-251

Palabras clave: PEPC, vía anaplerótica, nutrición amoniacal, metabolismo C/N.

## EFECTO DEL INHIBIDOR DE LA UREASA NBPT SOBRE LA NUTRICIÓN UREICA EN PLANTAS DE TRIGO

S2-P2

**E. Artola<sup>1</sup>, S. Cruchaga<sup>1</sup>, I. Ariz<sup>1</sup>, J. F. Moran<sup>1</sup>, M. Garnica<sup>2</sup>, F. Houdusse<sup>2</sup>, J.M. García-Mina<sup>2</sup>, C. Lamsfus<sup>1</sup>, P.M. Aparicio-Tejo<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup> *Departamento Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Campus de Arrosadía s/n, 31006 Pamplona.*

<sup>2</sup> *Departamento de I + D, Timac Agro-Grupo Roullier, Polígono Arazuri-Orcoyen, C/C N°32, 31160, Orcoyen, Navarra.*

La utilización de fertilizantes ha hecho posible un gran incremento en el rendimiento de los cultivos, pero su aplicación excesiva también está teniendo efectos negativos, tanto sobre la salud humana como sobre el medioambiente. En este sentido los principales problemas son los derivados de las emisiones de gases a la atmósfera y la contaminación de aguas por los lixiviados.

La urea puede ser una buena alternativa, ya que al degradarse libera amonio, retenible por el suelo. No obstante presenta también algunos inconvenientes, como la volatilización de amoniaco. Los inhibidores de la actividad de la enzima ureasa son uno de los métodos más empleados para minimizar estas pérdidas.

La mayoría de los estudios más recientes, tanto a nivel de laboratorio como en campo, se centran en el NBPT. Ha sido ensayado con numerosas especies (Grant 1998, Bremner 1995), y ha demostrado ser efectivo reduciendo la volatilización de amoniaco siendo aplicado a concentraciones muy bajas. Sin embargo, en varios ensayos se ha observado una acumulación de importantes cantidades de urea en hoja cuando se aplica urea conjuntamente con NBPT, llegando las plantas a mostrar ciertos síntomas de fitotoxicidad (Watson y Miller, 1996).

Para la realización del ensayo se suministró a las plantas una solución de urea a la que se añadió NBPT a distintas concentraciones. También se dispusieron a modo de control macetas a las que no se aplicó ningún fertilizante, y con el objetivo de comparar los resultados de la nutrición ureica con otro tipo de fertilización nitrogenada se añadió otro tratamiento, en el que se aportó la cantidad adecuada de nitrato amónico de manera que las unidades fertilizantes fueran las mismas que en los tratamientos con urea.

Tras un mes de crecimiento se observó una tendencia de incremento del peso seco de la parte aérea conforme aumentaba la dosis de NBPT. A nivel metabólico no se detectaron diferencias en las actividades de las enzimas estudiadas, pero sí en el contenido en hoja de algunos compuestos, como urea, aminoácidos totales y proteína soluble. Por otro lado, a pesar de observarse amarilleamiento de los ápices foliares al cabo de una semana tras la aplicación del tratamiento, este efecto fue transitorio, de manera que a la finalización del ensayo el crecimiento vegetativo de las plantas tratadas con el inhibidor fue comparable al de las fertilizadas con urea sola o nitrato amónico.

- 1) Bremner J.M. 1995. *Fertilizer Research*. 42:321-329.
- 2) Grant C.A. 1998. *Proceedings from the 10th Annual Meeting, Conference and Trade Show of the Saskatchewan Soil Conservation Association, Regina, SK. 11-12 February 1998.*
- 3) Watson C.J., Miller H. 1996. *Plant and Soil*. 184:33-45.



## EFFECTO DEL IÓN $\text{NO}_3^-$ SOBRE EL INFLUJO DEL IÓN $\text{NH}_4^+$ Y LA EXPRESIÓN DEL GEN *CITAMT1* EN PLANTAS DE CÍTRICOS

**Gemma Camañes, Miguel Cerezo y Pilar García-Agustín**

Área de Fisiología Vegetal. Dpto. de Ciencias Agrarias y del Medio Natural. Escuela Superior de Tecnología y Ciencias Experimentales. Universitat Jaume I, 12071 Castellón, España.

El N se encuentra presente en el suelo como una compleja mezcla de compuestos orgánicos e inorgánicos, siendo los iones  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  las principales fuentes de N mineral disponibles para la nutrición vegetal. Recientemente, Camañes y col. (2007) han mostrado que la actividad de los sistemas de transporte de alta afinidad (HATS) para el ión  $\text{NH}_4^+$  y la expresión del gen *CitAMT1* se correlacionan con la fotosíntesis siendo específicamente estimulados por la sacarosa. Sin embargo, existe escasa información de cómo se regula el influjo del ión  $\text{NH}_4^+$  y la expresión del gen *CitAMT1* en función del estado N. Por ello, el principal objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto de la adición del ión  $\text{NO}_3^-$  sobre el transporte del ión  $\text{NH}_4^+$  mediado por HATS y la expresión del gen *CitAMT1* en cítricos. El estudio se ha realizado en plántulas de citrange Troyer (*Citrus sinensis* L. Osbeck x *Poncirus trifoliata* Blanco), de tres meses de edad, cultivadas en cámara de cultivo con condiciones ambientales controladas. Los resultados confirman que al igual que ocurre en *Arabidopsis thaliana* (Gazzarrini y col., 1999) las plantas de cítricos prefieren absorber  $\text{NH}_4^+$  frente a  $\text{NO}_3^-$  cuando ambas formas están presentes, independientemente de su proporción, posiblemente porque supone un menor coste energético para la planta (Bloom y col., 1992). Además, los resultados han mostrado que aunque el influjo del ión  $\text{NH}_4^+$  mediado por el HATS y la expresión del gen *CitAMT1* en las raíces de cítricos parece estar regulada de un modo similar en función del estado N de la planta así como por la adición de  $\text{NH}_4^+$ , este no es el caso cuando se adiciona  $\text{NO}_3^-$  al medio. El ión  $\text{NO}_3^-$  no puede reprimir el influjo del ión  $\text{NH}_4^+$  mediado por el HATS, observándose al cabo de 3 días un incremento de la absorción del ión  $\text{NH}_4^+$  de aproximadamente un 65 %. Sin embargo, el ión  $\text{NO}_3^-$  parece que actúa como un potente inhibidor de la expresión del gen *CitAMT1* en las raíces de cítricos. En resumen, estos resultados sugieren que el ión  $\text{NO}_3^-$  no parece ser una fuente de N eficiente para los cítricos.

### Bibliografía

- 1) Camañes G, Cerezo M, Primo-Millo E, Gojon A y García-Agustín P. (2007) Ammonium transport and *CitAMT1* expression are regulated by light and sucrose in *Citrus* plants. *J. Exp. Bot.* 58: 2811 - 2825.
- 2) Gazzarrini S, Lejay T, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, von Wirén N (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into *Arabidopsis* roots. *The Plant Cell.* 11: 937-947
- 3) Bloom AJ, Sukrapanna SS, Warner RL (1992) Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiology.* 99: 1294-1301

## INHIBIDORES DE LA UREASA EN GERMINACIÓN (I): EFECTO SOBRE EL DESARROLLO DE LA PLÁNTULA

S2-P4

**J. Mezquiriz, S. Cruchaga, E. Artola, I. Ariz, J.F. Morán, P.M. Aparicio-Tejo, C. Lamsfus**

*Dpto. Ciencias del Medio Natural. Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadía s/n, 31006 Pamplona.*

La utilización de urea como fertilizante nitrogenado ha aumentado considerablemente en los últimos años, llegando a ser actualmente la forma de fertilización nitrogenada más empleada en el mundo. Sin embargo, las pérdidas de N por volatilización de amoníaco hacen que pueda perderse más del 50 % del nitrógeno aplicado (Bremner 1995). Se están desarrollando distintos métodos para reducir estas pérdidas, siendo la utilización de inhibidores de ureasa uno de los más empleados.

Otra consecuencia del empleo de urea como fertilizante son los efectos adversos sobre la germinación debidos al amonio generado tras la hidrólisis de la urea (Bremner y Krogmeier, 1989; Wang et al., 1995). Por lo tanto, al reducir la concentración de amonio en el suelo por efecto de los inhibidores de ureasa, la germinación se ve favorecida (Bremner y Krogmeier, 1988). Sin embargo, se debe tener en cuenta la aportación de la ureasa de la propia semilla en la obtención de N necesario para la síntesis de aminoácidos y proteínas durante el proceso de germinación y desarrollo de la plántula. En este sentido la utilización de inhibidores podría repercutir de manera negativa en estos procesos.

Con el objeto de estudiar los efectos producidos por los inhibidores de ureasa se aplicaron distintas dosis de ácido acetohidroxámico (AHA) y N-(n-butil) tiofosforo triamida (NBPT) a semillas en germinación. El ensayo se llevó a cabo sobre dos especies vegetales con modalidades metabólicas distintas (guisante y espinaca). Los parámetros analizados fueron la tasa de germinación y longitud radicular, que se determinaron a los días 2, 3, 4 y 7 desde el inicio del ensayo, así como el peso fresco y seco alcanzados por la plántula tras este periodo.

- 1) Bremner J.M. (1995). *Fertilizer Research*. 42: 321-329.
- 2) Bremner J.M., Krogmeier M.J. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85 4601-4604.
- 3) Bremner J.M., Krogmeier M.J. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86: 8185-8188.
- 4) Wang X.B., Xin J.F., Grant C.A., Barley L.D. (1995). *Canadian Journal Plant Science* 75, 449-452.

## INHIBIDORES DE LA UREASA EN GERMINACIÓN (II): EFECTO SOBRE EL METABOLISMO UREICO

S2-P5

**S. Cruchaga, E. Artola, J. Mezquiriz, I. Ariz, J.F. Morán, C. Lamsfus, P.M. Aparicio-Tejo**

*Dpto. Ciencias del Medio Natural. Universidad Pública de Navarra. Campus de Arrosadía s/n, 31006 Pamplona.*

La urea en los tejidos vegetales, para poder actuar como fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos, debe ser previamente hidrolizada por la enzima ureasa (EC.3.5.1.5) produciendo amonio. La importancia de la ureasa es evidente en los casos donde la urea es utilizada como fuente nitrogenada, pero además la urea es generada de manera endógena por la planta. La enzima arginasa participa en el ciclo de urea, importante en la movilización de reservas de la semilla durante la germinación, catalizando el paso de arginina a ornitina en una reacción en la que se libera urea.

El empleo de inhibidores de la ureasa durante la germinación de semillas puede comprometer la disponibilidad de nitrógeno procedente de esta vía y, dependiendo de la importancia del ciclo de la urea en el metabolismo nitrogenado, éste podría verse limitado. Son varios los trabajos que muestran un efecto directo de la aplicación de inhibidores de la ureasa sobre el metabolismo del N en plantas como raigrás (Watson, 1996 y 2005) y cereales (Krogmeier et al., 1989; Grant, 1998).

En este trabajo se ensayaron distintas concentraciones (50, 100 y 200µM) de dos inhibidores de ureasa (ácido acetohidroxámico y N-(n-butil) tiofosforo triamida) mediante su aplicación durante el periodo de germinación en guisante y espinaca. Pasada una semana desde el comienzo del ensayo se determinaron contenidos en urea, amonio, aminoácidos totales y proteína soluble, así como la actividad y la expresión de la enzima ureasa.

Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto una diferente efectividad en la inhibición de la ureasa mostrando el NBPT una mayor capacidad inhibitoria. Por otro lado la respuesta al tratamiento varió en función de la especie ensayada, poniendo en evidencia las diferencias entre el metabolismo nitrogenado de una y otra.

- 1) Grant C.A. 1998. Proceedings from the 10th Annual Meeting, Conference and Trade Show of the Saskatchewan Soil Conservation Association, Regina, SK. 11-12 February 1998.
- 2) Krogmeier M.J., McCarty G.W., Bremner J.M. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 1110-1112.
- 3) Watson C.J., Miller H. 1996. Plant and Soil. 184: 33-45.
- 4) Watson C.J. 2005. IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers, Frankfurt (Germany), 28-30 June 2005.

## ESTUDIOS FLUORIMÉTRICOS DE LAS GLUTAMINA SINTETASAS DE PLANTAS

G. Estivill<sup>1</sup>, M. Betti<sup>1</sup>, P. Guardado<sup>2</sup>, A. Maestre<sup>2</sup>, A.J. Márquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, <sup>2</sup>Departamento de Química-Física. Facultad de Química, C/ Profesor García González, 1; 41071-Sevilla (Spain), e-mail: cabeza@us.es

Se han llevado a cabo medidas de fluorescencia estacionaria para caracterizar el espectro de la Glutamina Sintetasa  $\alpha$  de *Phaseolus vulgaris*, y de la Glutamina Sintetasa plastídica de *Lotus japonicus*, y estudiar si se dan modificaciones en el espectro de emisión o en la intensidad de fluorescencia en presencia de diversos ligandos: nucleótidos, otros sustratos e inhibidores. Estos estudios se han hecho extensivos a varios mutantes para determinar la influencia de estas mutaciones sobre las propiedades de fluorescencia de la enzima.

Se han recogido los espectros de fluorescencia excitando a diferentes longitudes de onda (280, 295, 300 nm), obteniéndose espectros similares, con una  $\lambda_{\text{max}}$  de emisión característica del triptófano (335-340nm). Asimismo se han estudiado los espectros de excitación a distintas longitudes de onda de emisión, obteniéndose en todos los casos un espectro con una  $\lambda_{\text{max}} = 279.5$  nm, coincidente con el espectro de absorción de la enzima. Tanto la longitud de onda de emisión  $\lambda_{\text{max}}$  como la  $\Delta\lambda_{1/2}$ , 336 nm y 52 nm, respectivamente, para los residuos de triptófano, indican que estos fluoróforos se encuentran en un microambiente apolar, poco accesible al disolvente. El espectro de emisión de la GS se comparó con los de los mutantes, no encontrándose diferencias significativas, lo que indica que no existen grandes perturbaciones del entorno estructural de los residuos de triptófano como consecuencia de las mutaciones.

La adición de ATP a la enzima produce una disminución de la fluorescencia, contrariamente a lo que se observa para la GS procariótica (1). La adición de otros ligandos no modifica significativamente la señal de fluorescencia. La constante de asociación del ATP a la enzima determinada por fluorescencia a partir de la ecuación modificada de Stern-Volmer (2), es similar a la calculada mediante otras técnicas como la calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

### Referencias:

- (1) Ginsburg A, Gorman EG, Neece SH, Blackburn MB (1987) *Biochemistry* 26: 5989-5996.
- (2) Lehrer SS (1971). *Biochemistry* 10: 3254-3262.

Agradecimientos: Este trabajo se ha llevado a cabo gracias a la financiación del proyecto BFU2005-03120 y de la Junta de Andalucía (grupo BIO-163).

## **METABOLISMO DE UREIDOS DURANTE EL DESARROLLO DEL FRUTO DE JUDÍA (*PHASEOLUS VULGARIS*)**

**Rocío Lambert, María J. Raso, Manuel Pineda y Pedro Piedras**

*Departamento de Botánica, Ecología y Fisiología Vegetal. Grupo de Fisiología Molecular y Biotecnología de Plantas. Campus Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 1ª Planta. Universidad de Córdoba.*

### **Abstract**

Las leguminosas ureídicas (judía, soja, etc.) utilizan casi exclusivamente ureidos (alantoína y alantoato) como moléculas transportadoras del nitrógeno fijado y asimilado en los nódulos hacia las partes aéreas. Sin embargo, en condiciones de fertilización con nitrato, las amidas son los compuestos orgánicos transportados hacia las partes aéreas. Los ureidos son compuestos orgánicos relacionados con la urea y que presentan una relación N:C de 1:1 lo que los convierte en moléculas ideales de transporte de nitrógeno. En las partes aéreas de la planta, estos compuestos han de ser degradados para que el nitrógeno y el carbono que contienen puedan ser reasimilados en los tejidos en desarrollo. Pese a la importancia de estos compuestos como moléculas transportadoras de nitrógeno en plantas como judía y soja, el metabolismo de ureidos es una de los aspectos menos conocidos del metabolismo nitrogenado.

Se ha determinado el contenido de ureidos totales, así como los niveles de las actividades enzimáticas implicadas en la degradación de alantoína y alantoato durante la formación de frutos en plantas cultivadas en condiciones de fijación de nitrógeno, cultivadas con nitrato, y plantas sometidas a condiciones de sequía. Los frutos en desarrollo son un órgano sumidero con una elevada tasa de movilización de nutrientes para suministrar elementos a la semilla en desarrollo. El contenido en ureidos en frutos de plantas en condiciones de fijación de nitrógeno fue superior al de frutos de plantas cultivadas con nitrato y la concentración disminuyó a lo largo del desarrollo del fruto. Con respecto a las actividades enzimáticas, mientras que la actividad que cataliza la degradación de alantoína fue similar en ambas condiciones, la actividad que cataliza la degradación de alantoato fue ligeramente inferior en frutos de plantas cultivadas con nitrato. La distribución de ureidos y de actividades en las distintas partes de frutos sugiere que al embrión le llegaría el nitrógeno en una forma fácilmente accesible. En condiciones de déficit hídrico se observó un ligero incremento en la acumulación de ureidos tanto en frutos de plantas cultivadas con nitrato como en condiciones de fijación de nitrógeno.

### **Agradecimientos**

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2006-09366), la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (CVI1761) y el Plan Andaluz de Investigación (CVI-115).

## ESTUDIO FUNCIONAL DE LA ENZIMA ASPARTATO AMINOTRANSFERASA TIPO PROCARIOTA DE PLANTAS

S2-P8

**E. Lucas-Reina, M. F. Suárez, F. M. Cánovas**

*Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga.*

El nitrógeno presente en la biosfera constituye un elemento esencial para el buen desarrollo de las plantas, al formar parte de diversas moléculas como son los aminoácidos, proteínas, clorofilas, etc. Una vez que es reducido y asimilado por las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT) da lugar a los aminoácidos glutamina y glutamato [1]. Este último es uno de los sustratos de la enzima aspartato aminotransferasa (AAT) dependiente de PLP, responsable de la reacción reversible de transaminación en la que el glutamato junto con el oxalacetato son transformados a aspartato y 2-oxoglutarato. En el cloroplasto, el aspartato es un precursor de la ruta de síntesis de aminoácidos, tales como lisina, metionina, treonina e isoleucina, conocidos como “esenciales”, debido a la incapacidad de los mamíferos para sintetizarlos.

En plantas, se han identificado 4 isoenzimas diferentes para la AAT asociadas a distintos compartimentos celulares, como son el citosol, mitocondrias, peroxisomas y plastos [2]. No obstante, a partir del análisis de un banco de EST de RNAm de xilema de *Pinus pinaster*, se identificó en nuestro laboratorio, una secuencia codificante para una proteína de localización cloroplastídica. Esta isoenzima, a diferencia de las anteriores, está estrechamente relacionada con las AATs de cianobacterias y arqueobacterias, en lugar de con las enzimas eucarióticas. Este nuevo gen, conocido como *PT-PpAAT*, presenta ortólogos tanto en *Arabidopsis* (*AtAAT*) como arroz (*OsAAT*) [3].

A partir de los estudios realizados con un mutante del gen *asp5*, que codifica para la isoenzima cloroplastídica “tipo eucariota”, en el que no se encontró ningún cambio fenotípico significativo [4], se dedujo la posibilidad de que la ruta de síntesis de los aminoácidos “esenciales” permanecía intacta, al ser ésta, una ruta fundamental para el buen desarrollo de la planta, existiendo así un flujo continuo en el consumo de aspartato. De esta forma, y atendiendo a los parámetros cinéticos que indican que la reacción de transaminación en el cloroplasto se produce preferentemente hacia la síntesis de aspartato, y que la AAT tipo procariota (PT-AAT) es más afín para el glutamato que la isoforma plastidial “tipo eucariota” [5], propusimos un modelo para el metabolismo del aspartato en el interior cloroplasto. Así, en condiciones fisiológicas en las que la concentración de glutamato fueran bajas, sería la isoforma PT-AAT la que actuaría, garantizándose así el consumo de aspartato y con ello, la biosíntesis de aminoácidos “esenciales”. A altas concentraciones de glutamato, la síntesis de aspartato sería llevada a cabo fundamentalmente por la AAT “tipo eucariota” ya que tiene una eficiencia catalítica mayor en relación a la síntesis de aspartato y es más abundante.

El principal objetivo de este trabajo, es dilucidar la función de la enzima PT-AAT. Para realizar los estudios funcionales y evaluar la importancia de esta enzima sobre el crecimiento y desarrollo de los vegetales, estamos utilizando como especie modelo de plantas herbáceas *Arabidopsis thaliana* y de plantas leñosas *Populus tremula* x *P. alba*. En la actualidad estamos llevando a cabo el análisis de líneas transgénicas tanto de sobreexpresión del gen *PT-AAT* como del bloqueo de la expresión del mismo.

### Bibliografía

- 1) Lea, P.J *et al.* (1999). In: Singh BK, ed. Plant amino acids. Biochemistry and biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1-47.
- 2) Carolyn J. *et al.* (1995). *Plan Journal* 7 (1), 61-75.
- 3) De la Torre Fazio *et al.* (2006). *The Plant Journal*. 46: 414- 425.
- 4) Barbara H. *et al.* *Plan Physiology*. 129:650-660.
- 5) Cánovas *et al.* (2007). *Journal of Experimental Botany*. Vol. 58, No. 9, pp. 2307–2318.

## EL METABOLISMO DEL NITRÓGENO EN *Haloferax mediterranei* DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LA PROTEÍNA PII.

**Pedro-Roig, L.; Camacho, M.; Bravo, G.; Bautista, V.; Llorca, F.; Bonete, M.J.**

*Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Apartado 99. 03080 Alicante. España. (e-mail: laia.pedro@ua.es)*

Las arqueas halofílicas son organismos adaptados a entornos altamente salinos [1] cuyas enzimas son activas en concentraciones salinas a las que enzimas de microorganismos no halofílicos se inhiben o desnaturalizan, generando aplicaciones industriales y comerciales importantes [2].

El nitrógeno es un elemento esencial para los organismos vivos y su disponibilidad limita la productividad primaria tanto en ambientes naturales como en agricultura [3], de aquí la importancia de conocer las proteínas involucradas en el metabolismo de este elemento así como la regulación del mismo.

Una etapa crucial de la producción de aminoácidos, y del metabolismo celular en general, es la asimilación de nitrógeno y su regulación. En bacterias, la enzima central en la asimilación de amonio en condiciones limitantes es la glutamina sintetasa (GS), que cataliza la condensación de glutamato y amonio para formar glutamina. La actividad catalítica de la GS está regulada por adenililación, y la unión covalente de AMP a un residuo específico de tirosina de la GS se produce como respuesta a un aumento en la disponibilidad de nitrógeno intracelular. Esta modificación está catalizada por una adenilil transferasa, que a su vez está controlada por la proteína PII. La proteína PII regula las enzimas de transducción de señales o enzimas clave del metabolismo del nitrógeno [4]. Dependiendo de su estado de modificación, se une a diferentes enzimas alterando su actividad catalítica. Cuando PII está covalentemente modificada con UMP en un residuo de tirosina específico en cada subunidad promueve la desadenililación de la GS mientras que sin UMP promueve la adenililación de la GS, que inactiva a la enzima de esta forma.

Las proteínas PII son proteínas de transducción de señales altamente conservadas y distribuidas en Bacteria, Archaea y plantas, y desempeñan un papel fundamental controlando el metabolismo de asimilación de nitrógeno [5]. Son trímeros de 12-13 kDa por subunidad que interactúan con enzimas, factores de transcripción, y canales de amonio, regulando su actividad [6] y el balance carbono/nitrógeno.

La regulación del metabolismo del nitrógeno en Archaea y concretamente en *Haloferax mediterranei*, no se conoce. Nosotros hemos analizado los posibles genes que codifican proteínas del tipo PII en los genomas de haloarqueas disponibles, y hemos comprobado que el motivo conservado YRGAEY con la tirosina susceptible de modificación se encuentra en ellos. Sobre esta base hemos aislado el gen que codifica la proteína PII de *Haloferax mediterranei* a partir de una genoteca de Fago  $\lambda$ , y hemos secuenciado el DNA y realizado los análisis bioinformáticos posteriores.

### BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Kushner, D.J.(1978) En: Microbial Life in Extreme Environments. D.J. Kushner (ed), Academic Press, London. pp. 318.
- [2] Bonete, M.J., Ferrer, J., Camacho, M., Pire, C., Esclapez, J., Marhuenda-Egea, F., Martínez-Espinosa, R.M., Díaz, S., Llorca, F., Pérez-Pomares, F., Bautista, V. (2005) En: Microorganisms for industrial enzymes and biocontrol. E. Mellado and J.-L. Barredo (eds), Research Signpost, India. pp. 1.
- [3] Moreno-Vivián, C., Cabello, P., Martínez-Luque, M., Blasco, R., Castillo, F. (1999) J. Bacteriol. **181**, 6573.
- [4] Jiang, P. and Ninfa, A.J. (2007) Biochemistry **46**, 12979.
- [5] Ehlers, C., Weidenbach, K. Veit, K., Forchhammer, K., Schmitz, R.A. (2005) Mol. Microbiol. **55**, 1841.
- [6] Arcondeguy, T., Jack, R., Merrick, M. (2001) Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**, 80.

## MECANISMOS DE ADQUISICIÓN DE NITRÓGENO EN MICORRIZAS ARBUSCULARES

Nuria Ferrol, Jacob Pérez-Tienda y Concepción Azcón-Aguilar

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, España*

Las micorrizas arbusculares (MA) son simbiosis mutualistas entre ciertos hongos microscópicos del suelo (pertenecientes al phylum Glomeromycota) y la mayoría de las plantas que crecen sobre la superficie terrestre. En la simbiosis el hongo ayuda a la planta a absorber nutrientes minerales y agua a partir del suelo, mientras que esta cede al hongo compuestos carbonados procedentes de la fotosíntesis. Aunque el principal nutriente implicado en el efecto beneficioso de las MA es el fósforo, en determinadas condiciones las MA contribuyen a la mejora de la nutrición nitrogenada de la planta. Estudios de marcaje isotópico han puesto de manifiesto la capacidad de los hongos formadores de MA (hongos MA) de absorber y transferir a la planta tanto nitrógeno inorgánico ( $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ) como orgánico (aminoácidos), y que la forma molecular en la que el nitrógeno es transferido desde el hongo a la planta hospedadora es el  $\text{NH}_4^+$ . El objetivo del presente trabajo consistió en analizar los mecanismos implicados en la absorción y transferencia de nitrógeno en MA mediante el estudio de transportadores de  $\text{NH}_4^+$  de la planta y del hongo. Como modelo experimental se utilizó la simbiosis establecida entre plantas de arroz (*Oryza sativa*) y el hongo MA *Glomus intraradices*. En *G. intraradices* hemos identificado y caracterizado dos genes, *GintAMT1* y *GintAMT2*, que codifican transportadores de  $\text{NH}_4^+$  pertenecientes a la familia de transportadores AMT/MEP. El análisis de la expresión génica de los miembros de la familia AMT/MEP de arroz mostró que el desarrollo de la simbiosis incrementaba la expresión de los transportadores de  $\text{NH}_4^+$  AMT1;3 y AMT2;2 e inducía la expresión *de novo* del transportador AMT2;3. En esta presentación se discutirá la posible implicación en la nutrición nitrogenada de la planta de los transportadores del hongo y de la planta estudiados.



## SECUENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GLUTAMATO SINTASA DE *Haloferax mediterranei*

**Pire C., Martínez-Espinosa, R., Esclapez, J., Pérez-Pomares, F., Bonete, M.J.**

*Departamento de Agroquímica y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Apdo.99. 03080 Alicante. España (e-mail: Carmen.pire@ua.es)*

La ruta de asimilación de amonio que implica a glutamina sintetasa /glutamato sintasa, también conocida como la ruta GS/GOGAT es de crucial importancia en bacterias y en plantas, ya que los productos L-glutamina y L-glutamato actúan como moléculas clave donadoras de nitrógeno en las reacciones biosintéticas. La GS cataliza la síntesis de glutamina dependiente de ATP a partir de glutamato y amonio, a su vez la GOGAT utiliza glutamina junto con 2-oxoglutarato y 2 equivalentes de poder reductor para generar dos moléculas de glutamato. Las enzimas de esta ruta están por lo tanto ampliamente documentadas en *Bacteria* y en *Eukarya* mientras que el conocimiento en *Archaea* es un interesante campo abierto de estudio en este momento.

La enzima típica bacteriana es dependiente de NADPH (NADPH-GltS), está formada por dos subunidades, una subunidad grande (o  $\alpha$ ) y una pequeña (o  $\beta$ ) que forman el protómero activo  $\alpha\beta$ . La glutamato sintasa típica de plantas (Fd-GltS) depende de ferredoxina reducida como donador de electrones, está formada por una única cadena polipeptídica similar en secuencia y contenido de cofactores a la subunidad  $\alpha$  de las NADPH-GltS bacterianas. La glutamato sintasa eucariótica dependiente de NADH está formada por una única cadena polipeptídica cuya región N-terminal es similar a la subunidad  $\alpha$  de las NADPH-GltS bacterianas y con una región C-terminal similar a la subunidad  $\beta$  bacteriana. En *Archaea*, la secuenciación del genoma de *Methanococcus jannaschii*, reveló por primera vez la presencia de un marco abierto de lectura que posiblemente codificaría un polipéptido de 490 residuos que parece estar formado por un dominio N-terminal que contiene las cisteínas típicas de dos clusters [4Fe-4S] de ferredoxinas bacterianas seguido de un polipéptido que codificaría para el dominio sintasa (residuos aprox. 800-1180 de la subunidad  $\alpha$  de NADPH-GltS). Un ORF similar se ha encontrado en *Archeoglobus fulgidus* y parece estar conservado en otras *Archaea* y en *Thermatogales* como resultado de una transferencia lateral de genes.

En este trabajo se ha determinado la secuencia de la enzima glutamato sintasa de *Haloferax mediterranei*. Es una enzima de 1513 aminoácidos en la que se encuentran conservados los cuatro dominios típicos de la subunidad  $\alpha$ : dominio amidotransferasa N-terminal, dominio central, dominio de unión de FMN, y dominio C-terminal.

Las comparaciones realizadas con otras enzimas del dominio *Archaea* muestran que únicamente las enzimas halofílicas conservan esta típica organización de la subunidad  $\alpha$ . Además, en *Hfx. mediterranei* no se localiza aguas arriba o aguas abajo del gen que codifica para glutamato sintasa ningún marco de lectura que corresponda con un polipéptido similar a la subunidad  $\beta$  de la NADPH-GltS bacteriana. Por lo tanto parece que la enzima halofílica está compuesta por un único tipo de subunidad, estando por tanto más relacionada con la glutamato sintasa dependiente de ferredoxina.

Para la determinación de la actividad enzimática se han realizado cultivos en medio mínimo con distintas fuentes de nitrógeno y a distintos niveles. En estos extractos se ha medido la actividad de glutamato sintasa en función de distintos donadores de electrones: los coenzimas NADPH y NADH, ferredoxina aislada de *Hfx. mediterranei* y metil viológeno (MV) ambos reducidos con ditionito. En los resultados preliminares se obtienen mediante HPLC picos debidos a la formación de glutamato en extractos obtenidos de los cultivos mantenidos en ausencia de fuente de nitrógeno y en las medidas realizadas con MV y con ferredoxina.

Este trabajo está financiado por el proyecto GV/2007/184 de la Conselleria d'Empresa, Universitat i Ciencia. Generalitat Valenciana

## REGULACIÓN DIFERENCIAL DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE GLUTAMINA SINTETASA DE PINO POR Dof5

**Marina Rueda, Remedios Crespillo, Francisco M. Cánovas y Concepción Ávila**  
*Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Málaga. Campus de Teatinos s/n 29071-Málaga*

La asimilación de amonio en pino es catalizada por la Glutamina Sintetasa codificada por dos genes: *GS1a* y *GS1b*. Los dos productos génicos codifican isoformas de la enzima de localización citosólica y expresión tejido dependiente. Ambas isoformas desempeñan papeles diferentes y contribuyen de forma diferencial a la economía nitrogenada global en el árbol.

En estudios previos hemos aislado la región promotora de ambos genes de Glutamina Sintetasa y realizado un análisis de elementos *cis* con posible significación funcional en la regulación de la expresión diferencial de ambos genes. Esta búsqueda nos ha permitido caracterizar la existencia de posibles cajas de unión a factores de transcripción de la familia Dof.

Trabajos recientes en la bibliografía han mostrado la significación funcional de estos factores en la coordinación del metabolismo del carbono y del nitrógeno en plantas (Yanagisawa et al. (2004).

La regulación por factores de transcripción de un proceso crítico para el crecimiento y productividad del árbol como es la asimilación de amonio, nos ha llevado a caracterizar el posible impacto de un factor tipo Dof sobre la expresión de los genes de GS de pino.

Hemos aislado un cDNA de longitud completa de un factor tipo Dof de *P. Pinaster* (*PpDof5*). El estudio evolutivo de la familia de factores de transcripción tipo Dof en *Arabidopsis*, arroz y chopo sugiere que *PpDof5* podría pertenecer al mismo grupo en el que se encuadran algunos de los genes de *Arabidopsis* que están implicados en el desarrollo vascular (Shigyo et al. (2007)). En este trabajo, discutimos la posible implicación de *PpDof 5* en la regulación de la expresión de *GS1a* y *GS1b* y su implicación en el patrón de expresión diferencial de ambos genes para desempeñar su papel en la asimilación de amonio en árboles.

### Bibliografía:

- 1) Yanagisawa S, Akiyama A, Kisaka H, Uchimiya H, Miwa T (2004) Metabolic engineering with Dof1 transcription factor in plants: Improved nitrogen assimilation and growth under low-nitrogen conditions Proc Natl Acad Sci 101: 7833-7838.
- 2) Shigyo, M., Tabei, N., Yoneyama, T. and Yanagisawa, S. (2007) Evolutionary processes during the formation of the plant-specific Dof transcription factor family. Plant Cell Physiol. 48, 179-185.

## ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA GLUTAMINA SINTETASA Y LOS FACTORES INACTIVANTES IF7 E IF17 DE *Synechocystis* sp. PCC 6803 MEDIANTE MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.

**Lorena Saelices, Galmozzi CV, Florencio FJ, y Muro-Pastor MI**

*Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis*  
*Avda. Américo Vespucio nº 49. 41092. Sevilla*

La enzima glutamina sintetasa (GS) participa en el proceso de asimilación del amonio en cianobacterias junto con la glutamato sintasa (GOGAT) en el ciclo GS-GOGAT. Esta ruta está finamente regulada en cianobacterias, siendo la GS el punto clave de control. La cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 presenta dos tipos de GS, GSI y GSIII. La actividad de la GSI está regulada a nivel transcripcional y posttranscripcional. La regulación posttranscripcional está mediada por dos proteínas denominadas factores inactivantes (IFs) IF7 e IF17, cuya región carboxilo terminal presenta una alta identidad de secuencia. En condiciones de exceso de nitrógeno se induce la síntesis de estas proteínas, que interactúan con la GSI y la inactivan de forma reversible (1).

Con objeto de caracterizar esta interacción se han realizado estudios de mutagénesis dirigida tanto del factor IF17 como de la GSI. Para el análisis de IF17 se han seleccionado residuos altamente conservados entre IF7, IF17 y otras proteínas homólogas de cianobacterias. Dado que se ha demostrado previamente que la interacción entre la GSI y los factores es de naturaleza electrostática (2) y que estas proteínas presentan un elevado punto isoeléctrico, algunos residuos cargados positivamente podrían estar involucrados en la interacción de la GSI con los IFs. Una vez obtenidos los mutantes de los residuos seleccionados, se ha analizado su funcionalidad tanto *in vitro* como *in vivo*. En el análisis *in vitro*, se ha estudiado comparativamente la capacidad de inactivar a la GSI de los factores tanto silvestre como mutantes. Los resultados han permitido identificar algunos residuos de IF17 que son críticos para la inactivación de la GSI y por tanto su mutación debe afectar muy probablemente a la formación del complejo GSI/IF17.

### Bibliografía

- 1) García-Domínguez M., Reyes J.C. y Florencio F.J. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7161-7166
- 2) Mérida A., Candau P. y Florencio F. J. (1991) *Biochem Bioph Res Co* 181:780-786

## RESÚMENES DE LA SESIÓN N3

### Fijación de N<sub>2</sub> y desnitrificación

*In memoriam Prof. Antonio J. Palomares*

## REPLACEMENT OF THE BC COMPLEX BY A CYTOCHROME-C CONTAINING NITRATE REDUCTASE DURING THE ANAEROBIC ELECTRON TRANSPORT TO THE NITRITE, NITRIC OXIDE AND NITROUS OXIDE REDUCTASES OF *Thermus thermophilus*

Felipe Cava, Zahra Chahlafla, Laura Alvarez and José Berenguer

*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM-CSIC, 28049-Madrid*

The first isolates and type strains of the genus *Thermus* were described as obligate aerobes, despite the scarcity of oxygen in the thermophilic environments in which these organisms grow was evident. Further isolates were shown to have the ability to grow anaerobically by using alternative compounds as electron acceptors. Among them, some strains of *T. thermophilus* have been shown to grow by nitrate respiration with nitrite as the final product, while others can carry out a complete denitrification pathway (1).

In most cases, nitrate respiration is encoded by a conjugative element named NCE that can be transferred to other strains or been lost with ease (2). This NCE encodes a complete nitrate respiratory chain made of a rare type of hetero-tetrameric NADH dehydrogenase (Nrc) and an also rare membrane-bound nitrate reductase (Nar), which contains a periplasmic cytochrome c (NarC) in addition to the usual three components (NarG, NarH, NarI) found in equivalent respiratory nitrate reductases from other organisms (3). In addition, the NCE encodes four regulatory proteins that are required for the expression of this nitrate respiratory chain and for the repression of the main components of the aerobic respiratory chain, namely the Nqo type-I NADH dehydrogenase (complex I) (4), the bc1 complex (complex III) (unpublished), and the cytochrome oxidases (complex IV) (4).

In addition to its role as the main electron donor for the nitrate reductase, Nrc also functions as the major electron donor for the other enzymes of the denitrification pathway in the complete denitrifiers *T. thermophilus* PRQ16 and PRQ25. Actually, the expression of Nrc is induced by nitrate, nitrite and nitric oxide, and the growth of *nrc::kat* mutants under anaerobic conditions with any of the nitrogen oxides is strongly impaired (1). Moreover, DnrT, the CRP-like transcription factor that activates *nrc* transcription and represses simultaneously the transcription of the aerobic chain, is also induced by nitrite and nitric oxide (1). In consequence the bc1 complex is not expressed during denitrification, and another enzyme has to play its role as electron transport intermediate during the last steps of the denitrification pathway in *T. thermophilus*. As the Nar contains a cytochrome c and a cytochrome b, we wondered if this enzyme could play such a role.

A first evidence for this was the observation that the Nar was induced not only by nitrate and nitrite as in other systems, but also by NO. A second evidence was deduced from the fact that Nar is required for an efficient anaerobic growth with nitrite, NO and N<sub>2</sub>O, and for the electron transport towards nitrite and NO in *in vitro* assays. Further evidences showed that Nrc (through NrcE) and Nar (through NarI) interact probably forming a supracomplex. A final evidence was obtained by complementation of *narC::kat* mutants with NarC mutants defective in either of the two heme c binding motifs that it contains: we showed that the heme c binding motif close to the N-terminus is necessary for nitrite respiration, whereas the second has no effect to this respect.

We concluded from this work that Nar functions not solely as the terminal branch for nitrate respiration, but also as an electron bridge between the Nrc and the final reductases of the denitrification pathway.

### References

- 1) Cava et al 2008. *Env. Microbiol.* 10: 522-533
- 2) Ramírez-Arcos et al 1998. *J. Bacteriol.* 180:3137-3143
- 3) Zafra et al 2002. *FEBS Lett* 523:99-102
- 4) Cava et al. 2007. *Mol Microbiol* 64:630-646

## IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS REGULADORAS FixK<sub>2</sub> Y NifA EN EL PROCESO DE DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*.

**Emilio Bueno<sup>1</sup>, Socorro Mesa<sup>2</sup>, Eulogio J. Bedmar<sup>1</sup>, y María J. Delgado<sup>2</sup>.**

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, P. O. Box 419, 18080-Granada, Spain.<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Eidgenössische Technische Hochschule, Wolfgang-Pauli-Strasse 10, 8093 Zürich, Switzerland  
ebueno@eez.csic.es

*Bradyrhizobium japonicum* es capaz de reducir nitrato a nitrógeno molecular mediante el proceso de desnitrificación tanto en vida libre como asociado simbióticamente con plantas de soja. En *Bradyrhizobium japonicum*, la desnitrificación depende de los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDYFLX* los cuales codifican las enzimas nitrato, nitrito, óxido nítrico y óxido nitroso reductasa, respectivamente (1). En presencia de nitrato o un óxido de nitrógeno derivado y en condiciones limitantes de oxígeno, la expresión de los genes de la desnitrificación depende de la cascada reguladora FixLJ-FixK<sub>2</sub>-NnrR (1). En este trabajo, hemos estudiado la activación de la transcripción *in vitro* de los genes *napE*, *nirK* y *norC* por la proteína FixK<sub>2</sub>. La proteína FixK<sub>2</sub> previamente purificada, en cooperación con el factor transcripcional  $\sigma^{80}$  de la ARN polimerasa de *B. japonicum*, activó la transcripción *in vitro* de los promotores *napE* y *nirK*, pero no de *norC*. En *B. japonicum*, además del sistema FixLJ-FixK<sub>2</sub>-NnrR, se ha descrito otro sistema regulador dependiente de la proteína reguladora NifA que activa la transcripción de genes a concentraciones de oxígeno muy bajas (<2%) (2). Células de *B. japonicum* alteradas en el gen *nifA* mostraron un defecto en el crecimiento en condiciones anaeróbicas con nitrato. Una mutación en el gen *nifA* también dio lugar a una disminución de la expresión de los genes *napEDABC* y *nirK*, así como en los niveles de actividad nitrato y nitrito reductasa dependientes de metil viológeno (MV<sup>+</sup>) tras incubar las células en condiciones anaeróbicas con nitrato durante 4 días. Además, los niveles de transcrito obtenidos tras la extensión del promotor de *nirK* en la mutante *nifA* mediante el uso de primers específicos, fueron significativamente inferiores a los que se detectaron en la cepa parental. Todos estos resultados indican que, FixK<sub>2</sub> sería la proteína activadora de los genes *napEDABC* y *nirK* en respuesta a condiciones limitantes de oxígeno. Sin embargo, la máxima inducción de los genes *nap* y *nirK* requiere la presencia de la proteína NifA.

1. Bedmar *et al.*, 2005. Biochem. Soc. Trans. 33, 141-144.
2. Sciotti *et al.*, 2003. J. Bacteriology. 18, 5639-5642.

Este trabajo se ha subvencionado con los Proyectos AGL2006-13848-CO2-02/AGR concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia y 107PICO312 del Programa CYTED y la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación CVI-275. Emilio Bueno agradece al MEC la concesión de una beca FPU

## METABOLISMO DEL ÓXIDO NÍTRICO EN NÓDULOS DE SOJA

**Cristina Sánchez<sup>1</sup>, Toshiki Uchiumi<sup>2</sup>, David J. Richardson<sup>3</sup>, Eulogio J. Bedmar<sup>1</sup>, y María J. Delgado<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Estación Experimental del Zaidín, CSIC, P. O. Box 419, 18008-Granada, Spain;

<sup>2</sup>Department of Chemistry and Bioscience, Faculty of Science, Kagoshima University, Japan;

<sup>3</sup>School of Biological Sciences, Faculty of Sciences, University of East Anglia, UK. [cristina.sanchez@eez.csic.es](mailto:cristina.sanchez@eez.csic.es)

*Bradyrhizobium japonicum* es capaz de desnitrificar, es decir, reducir el nitrato a nitrógeno molecular en condiciones limitantes de oxígeno, tanto en vida libre como en simbiosis con plantas de soja. En *B. japonicum* USDA110, los genes responsables de este proceso se han identificado como: *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD*, y *nosRZDYFLX*, que codifican las enzimas nitrato-, nitrito-, óxido nítrico-, y óxido nítrico reductasas, respectivamente (1). Recientemente, se ha demostrado que la nitrato reductasa periplásmica (Nap) contribuye a la formación de complejos nitrosil-leghemoglobina (LbNO) en nódulos de soja en respuesta a nitrato e hipoxia (2). En este trabajo se ha demostrado, mediante fluorescencia con DAF-FM, que la producción de óxido nítrico (NO) se induce en nódulos de plantas de soja tratadas con nitrato y sometidas a encharcamiento. Además, dicho tratamiento resultó en una disminución de la expresión del gen *nifH*, que codifica la ferroproteína que forma parte del complejo nitrogenasa, así como de la actividad de esta enzima. Cuando las plantas se inocularon con una cepa mutante en el gen *napA* y se sometieron a nitrato y encharcamiento, no se observó inducción de la producción de NO en los nódulos. Al contrario de lo observado cuando las plantas se inocularon con la cepa parental, no se observó disminución de la expresión de *nifH* ni de la actividad nitrogenasa cuando las plantas inoculadas con la cepa *napA* se trataron con nitrato y encharcamiento. Estos resultados sugieren que el NO producido a través de la reducción de nitrato por parte de la Nap del bacteroide, que se acumula en el nódulo en respuesta a nitrato y encharcamiento, provoca un efecto negativo tanto en la actividad como en la expresión de la nitrogenasa.

### Referencias

- 1) Bedmar, E. J., Robles, E. F., and Delgado, M. J. 2005. The complete denitrification pathway of symbiotic N-fixing bacteria *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochem. Soc. Trans.* 35: 11-16.
- 2) Meakin, G. A., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E. J., Richardson, D. J. and Delgado, M. J. 2007. The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylleghaemoglobin complexes in soybean root nodules. *Microbiology*, 153:411-9.

Este trabajo se ha subvencionado con los Proyectos AGL2006-13848-CO2-02/AGR y CLG2006-06870/BOS concedidos por el Ministerio de Educación y Ciencia, con el proyecto de colaboración CSIC/Royal Society 2007GB0035 con Reino Unido y con la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación CVI-275. Cristina Sánchez agradece al CSIC la concesión de una beca I3P.

## HALOARQUEAS DESNITRIFICANTES: ¿BIORREMIEDIADORES O CONTRIBUIDORES AL CAMBIO CLIMÁTICO?

Rosa María Martínez-Espinosa, David J. Richardson\* y María José Bonete Pérez

*Departamento de Agroquímica y Bioquímica. División de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Campus de San Vicente del Raspeig, 03690 San Vicente del Raspeig, Alicante.\* Centre for Metalloprotein Spectroscopy and Biology, School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK.*

Algunas especies de haloarqueas, entre las que cabe destacar *Haloferax mediterranei* y *Haloarcula marismortui*, tienen la capacidad de emplear el nitrato como aceptor terminal de electrones en anaerobiosis gracias a la vía metabólica denominada desnitrificación. En nuestro grupo de investigación hemos escogido *Hfx mediterranei* como modelo de haloarquea desnitrificante para el estudio de esta vía y sus posibles aplicaciones en Biotecnología en general y Biorremediación en particular. En relación a éste último aspecto, hemos demostrado que *Hfx mediterranei* es capaz de crecer en salmueras que contienen elevadas concentraciones de nitrato y nitrito, fenómeno que hace posible la eliminación de estos iones de los medios de cultivo en los que crecen. Asimismo, es capaz de emplear como aceptores de electrones el perclorato y clorato (productos de desecho de industrias de fertilizantes, plaguicidas o la pirotecnia). Estos resultados sugieren que esta especie podría ser utilizada en procesos de biorremediación de salmueras contaminadas con este tipo de compuestos con el objetivo de reparar el daño causado por diversas actividades antropogénicas.

Sin embargo, cuando los desnitrificantes llevan a cabo esta vía de forma completa, se generan como productos de la misma, óxidos de nitrógeno como NO y N<sub>2</sub>O, los cuales contribuyen al efecto invernadero y a los procesos de destrucción de la capa de ozono. En este sentido, recientemente hemos demostrado que *Hfx mediterranei* es capaz de producir N<sub>2</sub>O en concentraciones nada despreciables durante su crecimiento en anaerobiosis empleando nitrato como fuente de nitrógeno. Tras estos resultados cabe preguntarse si al emplear estos microorganismos como agentes biorremediadores de aguas y suelos, se potencia en igual medida el deterioro ambiental por la generación de los óxidos mencionados previamente.

### Bibliografía

- 1) Martínez-Espinosa RM and Bonete MJ (2007) Bioremediation of chlorate and perchlorate salted water using in *Haloferax mediterranei*. Journal of Biotechnology, S227. DOI:10.1016/j.jbiotec.2007.07.411.
- 2) Martínez-Espinosa RM, Zafrilla B, Camacho M and Bonete MJ (2007) Nitrate and nitrite removing from salted water by *Haloferax mediterranei*. Biocatalysis and Biotransformation, 25, 295-300.
- 3) Martínez-Espinosa RM, Richardson DJ, Butt JN and Bonete MJ (2006) Respiratory nitrate and nitrite pathway in the denitrifier haloarchaeon *Haloferax mediterranei*. Biochemical Society Transactions, 34, 115-117.



## CARACTERIZACIÓN DE LA PROTEÍNA NnrR COMO ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES DE LA DESNITRIFICACIÓN EN *Bradyrhizobium japonicum*.

E.F. Robles<sup>1</sup>, F. Cutruzzolà<sup>2</sup>, T.Krell<sup>3</sup>, M.J. Delgado<sup>1</sup> y E J. Bedmar<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Apartado Postal 419, 18080-Granada, Spain.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Biología Celular y Molecular de Plantas, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Apartado Postal 419, 18080-Granada, Spain.

<sup>3</sup>Department of Biochemical Sciences "A. Rossi Fanelli", University of Rome La Sapienza, P. le Aldo Moro 5, 00185 Rome, Italy.

\*ejbedmar@eez.csic.es

En el cambio de condiciones aeróbicas a anaeróbicas, *Bradyrhizobium japonicum*, el microsimbionte de la soja, puede utilizar los óxidos de nitrógeno (NO<sub>x</sub>) como aceptores finales de electrones para la obtención de ATP. Durante la desnitrificación, el nitrato se reduce de forma secuencial a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso y dinitrógeno molecular mediante la actuación secuencial de las enzimas nitrato reductasa periplásmica (Nap), nitrito reductasa (Cu-Nir), óxido nítrico reductasa (cNor) y óxido nitroso reductasa (Nos), codificadas por los genes *napEDABC*, *nirK*, *norCBQD* y *nosRZDFYLX*, respectivamente. En *B. japonicum*, el control de la desnitrificación se lleva a cabo mediante el sistema FixLJ/FixK<sub>2</sub>/NnrR, donde . FixLJ es un sistema regulador de dos componentes en el que FixL es una quinasa capaz de detectar la concentración intracelular de oxígeno, y FixJ es un regulador de respuesta. FixJ activa a *fixK<sub>2</sub>* cuyo producto, la proteína FixK<sub>2</sub>, induce, a su vez, la expresión de los genes de la desnitrificación. Finalmente, la proteína NnrR es un activador transcripcional de la familia Fnr/Crp implicada en la respuesta a nitrato o a un NO<sub>x</sub> derivado de él. En este trabajo, la proteína NnrR se ha purificado a homogeneidad electroforética y se ha estudiado su unión a las regiones promotoras de los genes *nap*, *nir* y *nor*. Para ello, el gen *nnrR* se clonó en un vector de tipo pET sin colas de histidina, se indujo su expresión y el producto resultante se purificó utilizando columnas de intercambio iónico y de afinidad, obteniéndose un rendimiento de 3 mg de proteína/ml de cultivo. La proteína purificada se encontraba mayoritariamente en estado dimerico y su titulación con ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico indicó la presencia de un dominio hidrofóbico que podría representar un sitio de unión a ligandos. Utilizando calorimetría isotérmica de titulación, se ha comprobado que mientras NnrR se unió a un fragmento de ADN de la región promotora de los genes *norCBQD*, no lo hizo a fragmentos de ADN de las regiones promotoras de los genes *napEDABC* y *nirK*. La unión sólo ocurrió en condiciones de limitación de oxígeno, fue dirigida por cambios favorables en la entropía, y se caracterizó por una constante  $K_D$  de  $625 \pm 80$  nM. La estequiometría de la unión NnrR-DNA fue 0.99, que es consistente con la unión de un único dímero por fragmento de ADN. Estos resultados indican claras diferencias en la regulación de los genes de la desnitrificación por óxidos de nitrógeno, de manera que NnrR regula la transcripción de los genes *nor* pero no la de los genes *nap* y *nir*.

Este trabajo se ha subvencionado con fondos del Proyecto CGL2006-06870/BOS del Ministerio de Educación y Ciencia (MEC). También se agradece la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación BIO-275.

## MECANISMOS DE COMUNICACIÓN INTERCELULAR EN LA CIANOBACTERIA FILAMENTOSA *Anabaena* sp PCC 7120

**Mariscal, V; Merino-Puerto, V; Pernil, R; Herrero, A; Flores, E.**

*Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad de Sevilla, Sevilla*

Las cianobacterias filamentosas representan uno de los modelos más simples de multicelularidad conocidos. Las distintas células que forman el filamento se encuentran rodeadas de un espacio periplásmico y una membrana externa común a todas ellas. *Anabaena* sp. PCC 7120 es una cianobacteria filamentosa que en ausencia de nitrógeno combinado desarrolla unas células especializadas en fijar  $N_2$ , los heterocistos. En *Anabaena*, la operación de los procesos antagónicos de la fotosíntesis y de la fijación de nitrógeno se hace posible mediante la separación espacial de ambas funciones, produciéndose la fijación de  $CO_2$  en las células vegetativas y la fijación de  $N_2$  en los heterocistos. Esto exige que haya un trasiego de compuestos de nitrógeno fijado desde los heterocistos hasta las células vegetativas (posiblemente aminoácidos) y de compuestos de carbono fijado desde las células vegetativas hasta los heterocistos, por lo que podríamos considerar cada filamento de *Anabaena* como un organismo multicelular. En nuestro laboratorio estudiamos las posibles vías de transferencia de estos compuestos y los elementos moleculares implicados en las mismas. Se han identificado dos posibles rutas: el espacio periplásmico que rodea a todas las células del filamento constituyendo un conducto común a todas ellas y unas estructuras del septo que conectan las células del filamento. Mediante estudios de localización con GFP hemos demostrado que el espacio periplásmico es funcionalmente continuo. Esta vía implicaría la exportación de los compuestos al espacio periplásmico en las células productoras, la difusión de los mismos por el periplasma, y su importación al interior de las células receptoras. Hemos medido la salida de glutamina del heterocisto y de AIB (un análogo de la alanina) de las células vegetativas y hemos caracterizado dos importadores de Aminoácidos (NI y NII) que están implicados en el crecimiento diazotrófico. Por otra parte, hemos caracterizado la proteína SepJ, que se encuentra localizada en los septos celulares, cuya mutación causa la fragmentación del filamento e incapacidad de crecer diazotróficamente. Postulamos que esta proteína forme parte de un complejo proteico que constituya un poro de conexión de las células por el que difundirían moléculas hidrofílicas pequeñas.

## STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN DIFFERENT REGULATORS OF THE CONJUGATIVE ELEMENT NCE OF *Thermus thermophilus*

**Laura Álvarez, Zahra Chahlafla, Felipe Cava and José Berenguer.**

*Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", UAM-CSIC, Madrid, Spain.*

The genus *Thermus* was originally described as strict aerobic. However, the strain NAR1 is able to grow both in anoxia and presence of nitrate due to a nitrate reductase and a new type of NADH dehydrogenase, which are codified by the *nar* and *nrc* operons, respectively. These codifying genes are present in the bacterial chromosome, in a conjugative element designated NCE, which is able to promote its own transference to other aerobic strains of *Thermus* spp, turning them into facultative ones (1).

Usually, respiratory processes are regulated by the adjustment of the transcriptional response of the coding operons by regulators that respond to oxygen levels and others that detect the presence of the alternative electron acceptor, in this case, nitrate (2).

The analysis of the NCE sequences revealed the presence of two open reading frames named *dnrS* and *dnrT*, which codify for homologs of transcriptional regulators. Such genes are located between the *nar* and *nrc* operons, being expressed as a transcriptional unit induced by nitrate and anoxia. We have shown recently that under such conditions DnrT, a CRP homolog, is required for the expression of *nar* and *nrc* operons and for the repression of the *nqo* operon, encoding the main NADH dehydrogenase of the aerobic electron transport chain (3). In addition, there are two more putative regulators codified within NCE, called OrfA and OrfB, whose sequences relate them to the nitrogen metabolism, provided that there are homologs of unknown function closeby to respiration and nitrogen fixation genes located in big plasmids (1).

The different behaviour of the various promoters of the NCE in the presence or absence of the regulators in insertional mutants of the genes *dnrS* and *dnrT* (3), led us to wonder about the possible interaction between all these elements.

Using a bacterial two hybrid system, the interaction between DnrS, DnrT, OrfA and OrfB has been tested in the presence of different promoters. The results achieved show the existence of interaction between DnrS and DnrT, acquiring higher values of interaction when P<sub>nar</sub> promoter is present.

1. Cava F and Berenguer J. Biochem. Soc. Trans., 2006.
2. Zumft WG. MMBR, 1997.
3. Cava F et al. Mol. Microbiol., 2007.

## ANÁLISIS DE GENES IMPLICADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDOS NÍTRICO Y NITROSO EN *Haloferax mediterranei*.

Brugarolas, T.; Zafrilla, B.; Martínez-Espinosa, R.; Esclapez, J. y Bonete, M.J.

*Departamento de Agroquímica y Bioquímica. División de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Alicante. Campus de San Vicente del Raspeig. Carretera de San Vicente del Raspeig s/n. Alicante C.P. 03690*

*Haloferax mediterranei* es una arquea halófila desnitrificante capaz de asimilar  $\text{NO}_3^-$  en aerobiosis gracias a la nitrato reductasa asimilativa (Nas) o de emplear dicho ion como aceptor terminal de electrones en condiciones de anaerobiosis debido a la nitrato reductasa respiratoria (Nar) [1-3]. Nar reduce  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , que posteriormente es reducido a NO,  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{N}_2$  gracias a la nitrito reductasa respiratoria (NiR), la oxido nítrico reductasa (NOR) y la oxido nitroso reductasa (Nos), respectivamente. Esta vía, conocida como desnitrificación ha sido descrita en determinadas arqueas halófilas, pero hasta la fecha, no está claro si tiene lugar de forma completa, es decir si  $\text{N}_2$  es el producto final en todos los casos.

La Nar de *Hfx mediterranei* ha sido caracterizada por nuestro grupo de investigación tanto desde un punto de vista bioquímico como molecular. Recientes estudios fisiológicos han puesto de manifiesto la existencia de actividad nitrito reductasa en extractos crudos preparados a partir de medios de cultivo crecidos en anaerobiosis. Por otro lado, se ha puesto de manifiesto la producción de grandes cantidades de  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{N}_2\text{O}$  en estos cultivos.

Diversas aproximaciones moleculares han revelado la existencia en *Hfx mediterranei* de genes que codifican las enzimas NOR y Nos, lo que sugiere que la desnitrificación tiene lugar como vía completa en dicho microorganismo. Recientemente, en nuestro laboratorio, se han identificado y secuenciado parcialmente dichos genes, realizándose un análisis bioinformático preliminar.

### Bibliografía

- 1) R.M. Martínez-Espinosa, F.C. Marhuenda-Egea, M.J. Bonete, Assimilatory nitrate reductase from the haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: purification and characterisation, FEMS Microbiol. Lett. 204 (2001) 381–385.
- 2) B. Lledo, R.M. Martínez-Espinosa, F.C. Marhuenda-Egea, M.J. Bonete, Respiratory nitrate reductase from haloarchaeon *Haloferax mediterranei*: biochemical and genetic analysis. Biochim Biophys Acta 1674 (2004) 50–59.
- 3) R.M. Martínez-Espinosa, E.J. Dridge, M.J. Bonete, J.N. Butt, C.S. Butler, F. Sargent, D.J. Richardson, Look on the positive side! The orientation, identification and bioenergetics of 'Archaeal' membrane-bound nitrate reductases FEMS Microbiol Lett 276 (2007) 129–139.

Trabajo financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO200508991C0201).

**CHARACTERIZATION OF A NEW REGULATORY OPERON FROM THE NCE, THE NITRATE RESPIRATION CONJUGATIVE ELEMENT, FROM THE EXTREME THERMOPHILE *Thermus thermophilus*.**

**Zahra Chahlafi, Laura Álvarez, Felipe Cava and José Berenguer.**

*Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, UAM-CSIC, Madrid, Spain.*

A two genes operon (*orfAB*) was identified within the conjugative element NCE that allows *Thermus thermophilus* to use nitrate as an electron acceptor (1). This operon is localized downstream of the operon *narCGHJIKT* and encoded in the same DNA strand. The *orfA* gene encodes a 111 amino acid- long protein, with a theoretical size of 11.4 kDa. A search at the NCBI server revealed high percentages of identity with hypothetical proteins from denitrifying and N<sub>2</sub>-fixing bacteria, very frequently encoded between the *nor* and *nir* operons. The *orfB* gene encodes a 273 amino acid-long protein with a theoretical size of 30.6 kDa, also conserved in the denitrifiers and N<sub>2</sub>-fixers and clustered with OrfA homologues. OrfB possesses a N-terminal hemerythrin HHE domain. We expressed OrfA and OrfB in *E.coli* and prepared polyclonal rabbit antiserum against them. With such tools we were able to detect their expression in *Thermus thermophilus* NAR1 strain upon incubation with nitrate under anoxic condition. These results were in agreement with those obtained for the expression of the *Porf* promoter with a promoter probe vector (2). In both cases nitrate was more effective as inducer than anoxia. The further isolation of *orfA::kat* and *orfB::kat* mutants also supported a likely implication of these proteins in the Nitrate-sensing mechanism of *Thermus thermophilus*. To try to show this biochemically, the OrfA and OrfB proteins were over-expressed in *T. thermophilus* from vectors pWURorfA and pWURorfB in three cultures grown under aerobic, aerobic plus nitrate and anoxia plus nitrate conditions. A protease sensitivity assay revealed that OrfB was more sensitive to trypsin when nitrate was present in the culture than in its absence.

1) Ramírez-Arcos S and all. *Biochim. Biophys. Acta*, 1998.

2) Cava F and all. *Mol. Microbiol.*, 2007.

## RESÚMENES DE LA SESIÓN N4

Relación entre el metabolismo  
del carbono, nitrógeno y azufre

## REGULACIÓN DE LA INTERACCIÓN CARBONO/NITRÓGENO EN *PROCHLOROCOCCUS*

**Jose Manuel García Fernández, Antonio López Lozano, Guadalupe Gómez Baena, Oriol Alberto Rangel, Fermín Toribio y Jesús Díez**

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Severo Ochoa, 1ª planta. Campus de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba. bb1gafej@uco.es*

En el contexto actual de preocupación global por el cambio climático, la importancia de los estudios sobre uno de los principales fijadores de CO<sub>2</sub>, como *Prochlorococcus*, resulta evidente. Nuestro grupo estudia el metabolismo del nitrógeno y el carbono en esta cianobacteria marina, con el objeto de contribuir a la comprensión de los mecanismos evolutivos que le han permitido tener un éxito ecológico tan relevante.

En esta comunicación presentamos una revisión del conocimiento actual de la relación entre el metabolismo del carbono y el nitrógeno en *Prochlorococcus*. Estudios realizados por nuestro grupo sobre la regulación de las enzimas glutamina sintetasa (GS), isocitrato deshidrogenasa (IDH) y glutamato deshidrogenasa (GDH) han puesto de manifiesto una regulación diferente a la descrita en otras cianobacterias, aunque experimentos realizados con un inhibidor de la glutamato sintasa (azaserina) indican que la molécula implicada en la percepción del balance N/C en *Prochlorococcus* es el 2-oxoglutarato, tal y como se ha descrito para las cianobacterias en general.

Nuestro grupo ha realizado también una serie de estudios de expresión génica mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, en las estirpes *Prochlorococcus* SS120 y MIT9313 (adaptadas a vivir en profundidad). Hasta ahora se han estudiado los genes *glnA*, *glsF*, *icd*, *ntcA* y *glnB* (codificantes de GS, GOGAT, IDH, el regulador global del nitrógeno NtcA, y la proteína P<sub>II</sub>, respectivamente) en la estirpe SS120, y *glnA* y *gdhA* (codificantes de GS y GDH, respectivamente) en la estirpe MIT9313. El análisis de estos resultados confirma que, efectivamente, la regulación del metabolismo del N/C es diferente a otras cianobacterias; además, parecen existir diferencias claras entre ambas estirpes, que sugieren mecanismos regulatorios modificados incluso entre dos estirpes adaptadas a vivir en condiciones similares. Estos resultados se analizarán en relación a otras estirpes de *Prochlorococcus*, así como al sistema de control en cianobacterias, para proponer un modelo inicial de regulación en *Prochlorococcus*.

*Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2006-10011/BMC), la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia P07-CVI-3055) y la Universidad de Córdoba (Programa Propio de Investigación). A.L.L. y G.G.B. recibieron un beca predoctoral del MEC y la JA, respectivamente. O.A.R. recibió una beca de investigación de la UCO.*

## METABOLISMO DE CARBONO Y NITRÓGENO EN PLANTAS DE *Lotus japonicus* SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO: UN ESTUDIO DE TRANSCRIPTÓMICA.

**Marco Betti<sup>1</sup>, Pedro Díaz<sup>1-2</sup>, Diego Sánchez<sup>3</sup>, Jorge Monza<sup>2</sup>, Antonio Márquez<sup>1</sup>.**

*(<sup>1</sup>) Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, España* *(<sup>2</sup>) Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay.* *(<sup>3</sup>) Max Planck Institute for Molecular Plant Physiology, Wissenschaftspark Golm, Am Mühlenberg 1, Potsdam-Golm, D14 47, Alemania.*

El estrés por sequía constituye uno de los problemas frecuentes que afecta la productividad y persistencia de las leguminosas en los pastizales. La especie modelo *Lotus japonicus* está muy emparentada con especies de interés agrícola, tales como *L. corniculatus* y *L. glaber* que se siembran principalmente en el cono sur americano y resulta un buen modelo para estudiar las respuestas a estrés de estas leguminosas<sup>1</sup>. Las plantas responden al estrés por sequía alterando su permeabilidad al agua, incrementando el daño oxidativo, incrementando las defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas e incrementando la síntesis de osmolitos compatibles. Aunque determinados enzimas y metabolitos son los principales actores en la respuesta celular a la deshidratación, el análisis masivo de las variaciones de los transcritos permite obtener informaciones muy valiosas sobre la estrategia global de respuesta al estrés de la planta<sup>2</sup>. Por eso, en nuestro laboratorio hemos llevado a cabo un análisis transcriptómico de plantas de la leguminosa modelo *Lotus japonicus* en condiciones control y de estrés hídrico utilizando *chips* específicos de *Affymetrix*. Se detectaron un total de 898 transcritos que variaban por lo menos dos veces en las plantas estresadas, 64 de los cuales cambiaron más de 8 veces. Un total de 10 rutas metabólicas fueron moduladas de manera significativa ( $p < 0,10$ ). Se evidenció un aumento de los transcritos relativos a la biosíntesis de prolina y de GABA, mientras que enzimas del metabolismo del nitrógeno, tales como GS, GOGAT y GDH no cambiaron significativamente. Por otra parte, se detectaron cambios significativos en el metabolismo de almidón y sacarosa, así como un descenso en la transcripción de los genes que codifican para las subunidades de la RUBISCO, evidencia que el metabolismo del carbono se ve también afectado como consecuencia del estrés hídrico. En paralelo con los datos de transcriptómica se muestran cambios en las concentraciones de metabolitos, actividades enzimáticas y cantidad de proteínas específicas. En general las rutas metabólicas más afectadas por el estrés hídrico muestran cambios coherentes a distintos niveles; por ejemplo, el aumento de la transcripción de los genes para la biosíntesis de prolina y GABA, es seguido por un aumento de dichos metabolitos y de actividades enzimáticas relacionadas<sup>3</sup>. Se analiza también el efecto del estrés hídrico sobre otras rutas metabólicas que pueden tener un papel importante en la tolerancia a estrés tales como síntesis del glutatión, la detoxificación de especies reactivas del oxígeno, la biosíntesis de hormonas y metabolitos secundarios.

Agradecimientos: Proyectos LOTASSA (FP6-2003-INCO-DEV2 PL-517617) y Junta de Andalucía (Proyecto P07-CVI-03026)

(1) Díaz P.; Borsani O. and Monza J. 2005. Lotus related species and their agronomic importance. In: Lotus japonicus Handbook. A Márquez (Ed.). pp 25-37.

(2) Sánchez D.H., Lippold F., Redestig H., Hannah M.A., Erban A., Kramer U., Kopka J., Udvardi M.K. 2008. Integrative functional genomics of salt acclimatization in the model legume *Lotus japonicus*. Plant J. 53:973-978.

(3) Díaz P.; Borsani O.; Márquez A. and Monza J. 2005. Osmotically induced proline accumulation in *Lotus corniculatus* leaves is affected by light and nitrogen source. Plant Growth Regulation. 46:223-232.



## MECANISMO DE REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL DE LA GLUTAMINA SINTETASA DE TIPO I EN CIANOBACTERIAS

Carla V. Galmozzi, Saelices L, Florencio F. J, y Muro-Pastor M. I.

*Instituto de bioquímica vegetal y fotosíntesis. Universidad de Sevilla-CSIC. Avenida Américo Vespucio nº 49. 41092, Sevilla*

La asimilación del nitrógeno en cianobacterias ha sido objeto de extensos estudios, que demuestran que dicho proceso está sujeto a un control exhaustivo tanto a nivel transcripcional como posttranscripcional. La incorporación del nitrógeno a esqueletos carbonados se lleva a cabo principalmente a través de la acción secuencial de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y glutamato sintasa (GOGAT), constituyendo el ciclo conocido como GS-GOGAT. Este ciclo es el nexo de unión entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno. La GS representa el punto clave del ciclo ya que se encuentra fuertemente regulada con objeto de optimizar los flujos de ambos elementos. Se ha demostrado que la GS responde a fluctuaciones en la disponibilidad de carbono y nitrógeno, así cuando el carbono es abundante la deficiencia de nitrógeno provoca un alto nivel de actividad GS, sin embargo cuando la disponibilidad de nitrógeno es alta la actividad GS disminuye, sin cambios significativos en la cantidad total de proteína (Reyes y Florencio, 1995).

Se ha descrito que el mecanismo de regulación postraduccionale reversible de la GS en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 requiere una interacción directa proteína-proteína entre la GS y dos factores inactivantes (IFs). Ambos factores denominados IF7 e IF17 son proteínas de 7 y 17 kDa, codificadas por los genes *gifA* y *gifB* respectivamente (García-Domínguez *et al.*, 1999). La transcripción de los genes *gif* se induce en presencia de amonio de forma dependiente del regulador global NtcA (García-Domínguez *et al.*, 2000). Hemos analizado la evolución de la cantidad de los IFs en células de *Synechocystis* a lo largo del proceso de inactivación/reactivación, encontrando que la adición de amonio provoca la acumulación de las proteínas IF7 e IF17 y la consecuente inactivación de la enzima, mientras que la eliminación del amonio conlleva la reactivación y la rápida desaparición de los IFs. Por otra parte, se analizó la acumulación de las proteínas IF7 e IF17 en estirpes mutantes donde la transcripción de los genes *gif* es independiente de las condiciones nitrogenadas y observamos que la presencia de amonio aumenta la estabilidad de la proteína IF17, pero no de la proteína IF7. Hemos demostrado la implicación de metalopeptidasas solubles en la degradación de la proteína IF7. Dicha implicación se ha puesto de manifiesto tanto *in vitro* como *in vivo* utilizando estirpes mutantes de *Synechocystis*. Por otra parte se ha estudiado el papel que juega la interacción con su diana, la GSI, en la estabilidad de los IFs. Utilizando una estirpe carente de GSI se ha demostrado el papel protector crucial que juega la presencia de la GS sobre la estabilidad de IF7 e IF17 (Galmozzi *et al.*, 2007). Con objeto de caracterizar la interacción entre la GS y los IFs nos propusimos identificar residuos de los IFs implicados en la inactivación de la GS tanto *in vitro* como *in vivo*. Para ello realizamos la mutagénesis dirigida de residuos de IF7, conservados en otras proteínas homólogas, demostrando que los residuos de lisina 19 y arginina 21 de la proteína IF7 son críticos para su funcionalidad *in vitro* e *in vivo*. Finalmente hemos extendido el estudio del mecanismo de regulación de la GSI basado en su interacción con los IFs a cianobacterias fijadoras de dinitrógeno como *Anabaena* sp. PCC 7120, donde hemos identificado un gen que codifica una proteína homóloga a IF7.

-Galmozzi, C.V., Fernandez-Avila, M.J., Reyes, J.C., Florencio, F.J., and Muro-Pastor, M.I. (2007) The ammonium-inactivated cyanobacterial glutamine synthetase I is reactivated *in vivo* by a mechanism involving proteolytic removal of its inactivating factors. *Mol Microbiol* **65**: 166-179.

-García-Domínguez, M., Reyes, J.C., and Florencio, F.J. (1999) Glutamine synthetase inactivation by protein-protein interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7161-7166.

-García-Domínguez, M., Reyes, J.C., and Florencio, F.J. (2000) NtcA represses transcription of *gifA* and *gifB*, genes that encode inhibitors of glutamine synthetase type I from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol Microbiol* **35**: 1192-1201.

-Reyes, J.C., and Florencio, F.J. (1995) A novel mechanism of glutamine synthetase inactivation by ammonium in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Involvement of an inactivating protein. *FEBS Lett* **367**: 45-48.

## GLUTAMATO DESCARBOXILASA Y PRODUCCIÓN DE GABA ASOCIADO AL DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE PINO

Juan Jesús Molina<sup>1</sup>, María Belén Pascual<sup>1</sup>, José Pissarra<sup>2</sup>, Francisco M. Cánovas<sup>1</sup> y Fernando Gallardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga e Instituto Andaluz de Biotecnología, Campus Universitario de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain.

<sup>2</sup>Instituto de Biología Molecular e Celular (IBMC), Rua do Campo Alegre, 823, 4150-180 Porto, Portugal.

La glutamato descarboxilasa (GAD) es una enzima citosólica que cataliza la producción de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) mediante la descarboxilación de glutamato y el consumo de protones. Se ha descrito en varias especies herbáceas que la GAD está codificada por varios genes y a diferencia de animales, la de plantas posee un dominio de unión a calmodulina, lo que sugiere que la síntesis de GABA está regulada por los niveles de calcio citosólicos. Aunque se ha sugerido que el GABA, en plantas herbáceas, puede actuar como reservorio temporal de nitrógeno, en la defensa contra insectos fitófagos, como crioprotector y estabilizador del pH (1), varios trabajos han revelado que la síntesis de GABA puede estar relacionada con procesos de elongación celular y regulación génica (2, 3 y 4). No obstante, el papel fisiológico del GABA en plantas leñosas permanece poco definido. Recientemente se han detectado clones de GAD en genotecas de cDNA de la región cambial en varias especies leñosas, incluyendo pino y chopo. En este trabajo se muestran los datos de caracterización de la GAD de pino, estudios de expresión durante el desarrollo y crecimiento del hipocótilo, así como la localización del GABA en cortes histológicos. Nuestros datos sugieren que la expresión de la GAD puede ser un factor importante en la diferenciación del tallo y formación de la madera.

1) Shelp, B.J., Bown, A.W. y McLean, M.D. (1999) Metabolism and functions of gammaaminobutyric acid. *Trends Plant Sci.* **4**, 446-452.

2) Baum, G., Lev-Yadun, S., Fridmann, Y., Arazi, T., Katsnelson, H., Zik, M. y Fromm, H. (1996) Calmodulin binding to glutamate decarboxylase is required for regulation of glutamate and GABA metabolism and normal development in plants. *EMBO J.* **15**, 2988-2996.

3) Kathiresan, A., Miranda, J., Reid, D.M. y Chinnappa, C.C. (1998)  $\gamma$ -Aminobutyric acid promotes stem elongation in *Stellaria longipes*: the role of ethylene. *Plant Growth Regul.* **26**, 131-137.

4) Lancien, M. y Roberts, M.R. (2006) Regulation of Arabidopsis thaliana 14-3-3 gene expression by gamma-aminobutyric acid. *Plant Cell Environ.* **29**, 1430-1436.

## TRANSPORTE DE GLUCOSA EN *PROCHLOROCOCCUS*

Guadalupe Gómez-Baena<sup>1</sup>, Antonio López-Lozano<sup>1</sup>, Jorge Gil-Martínez<sup>2</sup>, Jose Manuel Lucena<sup>2</sup>, Jesús Diez<sup>1</sup>, Pedro Candau<sup>2</sup> y Jose Manuel García-Fernández<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Severo Ochoa, 1ª planta.*

*Campus de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba*

<sup>2</sup> *Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla – CSIC. Avda. Américo Vespucio, s/n, 41092-Sevilla*  
*v52gobag@uco.es*

Hasta el momento, *Prochlorococcus* ha sido considerado un organismo autótrofo estricto. El presente trabajo es el primero en el que se aborda el estudio de la utilización de glucosa como fuente de carbono en esta cianobacteria.

En primer lugar, se determinaron las cinéticas de transporte de glucosa radiactiva en poblaciones separadas mediante citometría de flujo. Se utilizaron varias estirpes representativas de los ecotipos de superficie y profundidad de *Prochlorococcus*, así como de la estirpe PCC 6803 de *Synechocystis*, cuya capacidad de crecer en condiciones heterotróficas ha sido ampliamente estudiada. Además, se cuantificó mediante RT-PCR en tiempo real la expresión del gen *melb*, que codifica un transportador de glucosa en la estirpe SS120. Nuestros resultados indican que todas las estirpes de *Prochlorococcus* estudiadas son capaces de transportar glucosa, pero sin mostrar diferencias entre los ecotipos de profundidad y superficie. Para demostrar que esta glucosa, no sólo se transportaba, sino que era asimilada, se determinó mediante RT-PCR en tiempo real, la expresión de los genes que codifican la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y la 6 fosfogluconato deshidrogenasa, en presencia de glucosa. Estas proteínas se encuentran al inicio de la ruta de las pentosas fosfato y despertaron nuestro interés debido a que las reacciones que catalizan dan como producto NADPH. Por último, se determinó la expresión de los genes *glnA*, *icd*, *ntcA*, *glnB*, *glsF* en presencia de glucosa, como parte del estudio de las diferentes adaptaciones metabólicas que *Prochlorococcus* ha desarrollado en relación a la interacción entre el metabolismo del nitrógeno y del carbono.

Nuestros resultados parecen indicar que pese a lo que se creía hasta el momento, *Prochlorococcus* en realidad es un organismo mixótrofo. Estos resultados confirman un vez más, la gran versatilidad metabólica de *Prochlorococcus* junto con su capacidad de adaptación a las necesidades derivadas del hábitat en el que vive y favorece su gran éxito ecológico [1].

1) García-Fernández, J.M., y Diez, J., (2004). Adaptive mechanisms of the nitrogen and carbon assimilatory pathways in the marine cyanobacteria *Prochlorococcus*. *Research in Microbiology* 155: 795-802.

*Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC, BFU2006-10011/BMC), la Junta de Andalucía (JA, Proyecto de Excelencia P07-CVI-3055) y la Universidad de Córdoba (UCO, Programa Propio de Investigación). G.G.B., A.L.L. y J.G.M. recibieron una beca predoctoral de la JA, MEC y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas, respectivamente.*

## PAPEL DE SIPA EN LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE NITRÓGENO E INTERACCIONES CON LOS REGULADORES NON BLEACHING NBL5 Y NBLR

**Ruiz D; Salinas P; Cantos R; Contreras A**

*Dpto. Fisiología, Genética y Microbiología. Universidad de Alicante.*

*03690 San Vicente del Raspeig, Alicante.*

Uno de los mecanismos de adaptación a cambios ambientales más estudiados en cianobacterias es el proceso de clorosis o *bleaching*, que implica la degradación de los complejos antena del aparato fotosintético como respuesta a diferentes tipos de señales ambientales. La histidina quinasa NblS (Non-bleaching Sensor) de *Synechococcus* sp. PCC 7942, denominada DspA ó Hik33 en el caso de *Synechocystis* sp. PCC 6803, juega un papel fundamental en la regulación del proceso de clorosis en estos organismos como respuesta a situaciones de exceso de luz y carencia de nutrientes como nitrógeno, azufre o fósforo. A pesar de la demostrada importancia de esta proteína en la aclimatación de las cianobacterias a cambios ambientales y de ser la histidina quinasa más conservada en este grupo de organismos, se desconocen tanto las señales que detecta NblS como la identidad de los componentes de la correspondiente ruta de transducción de señales. Se ha propuesto, pero en absoluto demostrado, que NblS podría regular a NblR, un regulador de respuesta implicado en la activación de la transcripción de *nblA* en condiciones de estrés.

Nuestro grupo ha identificado una nueva proteína de función desconocida, SipA (NblS interacting protein A), capaz de regular la actividad de NblS interaccionando específicamente con el dominio de unión a ATP de esta histidina quinasa. SipA parece cooperar con NblS en la regulación de parte de sus múltiples funciones. Además, SipA contrarresta funciones de NblR claves para la aclimatación a estrés. Presentaremos datos recientes sobre la regulación de la expresión génica de *sipA* y discutiremos el posible papel de la interacción SipA-NblS en el contexto de la compleja red de transducción de señales y fosforilación implicada en la respuesta general a estrés en cianobacterias.

Investigación financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia, proyectos BFU2005-02231, BFU2006-12424.

### Bibliografía:

Espinosa, J, Fuentes I., Burillo S., Rodríguez-Mateos, F., and A. Contreras. "SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NblS". *FEMS Microbiology letters* (2006). 254: 41-47.

Salinas, P., Ruiz, D., Cantos, R., López-Redondo, M.L., Marina, A. and Contreras, A. "The regulatory factor SipA provides a link between NblS and NblR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942". *Molecular Microbiology* (2007). 66 (6): 1607-1619.

## BASES ESTRUCTURALES DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR LA PROTEÍNA P<sub>II</sub>: ESTRUCTURA DEL COMPLEJO DE LA PROTEÍNA P<sub>II</sub> CON SU DIANA CIANOBACTERIANA, LA PROTEÍNA PipX

**José Luis Llácer<sup>1</sup>, Ignacio Fita<sup>2</sup> y Vicente Rubio<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>*Instituto de Biomedicina de Valencia (IBV-CSIC) y CIBERER, Jaime Roig 11, Valencia-46010.*

<sup>2</sup>*Instituto de Biología Molecular de Barcelona (CSIC-Parc Científic/Institut de Recerca Biomédica, Barcelona)*

La proteína trimérica P<sub>II</sub> señala la abundancia de nitrógeno/carbono, interaccionando con numerosas proteínas diana. Se han descrito las estructuras de los complejos de P<sub>II</sub> con el canal de amonio AmtB y con la enzima acetilglutamato quinasa (NAGK), que es una diana clave de P<sub>II</sub> en cianobacterias y plantas. Ahora describimos el complejo cristalino de P<sub>II</sub> con la otra diana cianobacteriana demostrada, la proteína posiblemente adaptadora PipX, una proteína de 89 residuos que se une a P<sub>II</sub> en condiciones de alto nitrógeno. Sin embargo, en condiciones de bajo nitrógeno (y alto 2-oxoglutarato), PipX no está unida a P<sub>II</sub> e interacciona con el factor de transcripción NtcA, activando la transcripción de genes regulados por este factor. Así, P<sub>II</sub> sería un quelante de PipX, retirando a PipX del medio, impidiendo su acción sobre NtcA.

Hasta ahora no se conocía la estructura ni el modo de acción de PipX. Ahora describimos la estructura cristalina del complejo de PipX con P<sub>II</sub>, ambos de *Synechococcus elongatus* cepa PCC 7942. Para la preparación del complejo se mezclaron ambas proteínas en forma diluida y se concentró la mezcla por ultrafiltración. Los cristales del complejo crecieron tras varios meses en gota colgante, permitiendo obtener espectros de difracción de rayos X a 3.2 Å de resolución. El reemplazo molecular usando un trímero de P<sub>II</sub> (de nuestro complejo con acetilglutamato quinasa, archivo PDB 2v5h) como modelo dio resultado positivo para la porción P<sub>II</sub> del complejo, construyéndose el modelo de PipX en la densidad correspondiente aplicando simetría no cristalográfica y aplanamiento de solvente.

El complejo es un trímero de P<sub>II</sub> (112 residuos por subunidad) asociado a tres subunidades de PipX, que se unen a P<sub>II</sub> por la cara plana de esta proteína señalizadora. Las subunidades de PipX pueden describirse como discos formados por un sandwich beta de 4 y 2 elementos (horquilla  $\beta$ ) antiparalelos, que en su periferia presenta dos  $\alpha$ -hélices C-terminales de las que la distal es muy móvil. Las horquillas  $\beta$  de las tres subunidades interaccionan entre sí, formando una capa continua que proporciona una superficie plana de interacción con la superficie plana de P<sub>II</sub>. Así, PipX forma en la superficie de P<sub>II</sub> un trímero en forma de hoja de trébol. Los tres lazos T del trímero de P<sub>II</sub> abrazan desde afuera el trímero de PipX, insinuándose entre cada dos subunidades, formando una hoja beta continua con la capa beta de cuatro elementos del sandwich de cada subunidad de PipX. Como tanto PipX como acetilglutamato quinasa se unen a la misma cara de P<sub>II</sub>, cabe esperar que el complejo con PipX impida la formación del complejo de P<sub>II</sub> con acetilglutamato quinasa y viceversa. La conformación del lazo T de P<sub>II</sub> difiere de la observada en los complejos con la enzima y con AmtB, confirmando la plasticidad del lazo y la existencia de distintos modos de unión de P<sub>II</sub> con sus dianas a pesar de implicar en todos ellos al lazo T. La serina 49 del lazo queda lejos de PipX, por lo que, al contrario de lo que sucede para la unión de P<sub>II</sub> a acetilglutamato quinasa, la fosforilación de S49 no debe abolir la unión de P<sub>II</sub> con PipX. Sin embargo, la unión descrita del 2-oxoglutarato a P<sub>II</sub> sucede en la zona de interacción de esta proteína con PipX, apuntando a un efecto negativo de este ligando sobre la formación del complejo. La movilidad de la hélice C-terminal hace que pueda proyectarse centrifugamente desde el lado más lejano del eje ternario, o formar una horquilla replegada, sugiriendo un papel de estas hélices en exploración e interacciones con otros elementos.

Ayuda BFU2004-05159, MEC

## INTERACCIONES PII-PIPX: FUNCIÓN DE LOS COMPLEJOS Y RESIDUOS IMPLICADOS

**Miguel Ángel Castells, Javier Espinosa y Asunción Contreras**

*Universidad de Alicante. Departamento de Fisiología, Genética y Microbiología.  
División de Genética*

La proteína PII, es una de las proteínas transductoras de señales más conservadas y ampliamente distribuidas en la naturaleza. En cianobacterias, PII regula el transporte de nitrato/nitrito en presencia de amonio, la actividad nitrato reductasa, la actividad del enzima N-acetilglutamato Kinasa (NAGK) y la actividad del regulador NtcA, componente clave en el control por nitrógeno en cianobacterias, que regula la expresión de genes sujetos a represión por amonio.

PII es capaz de responder a los niveles de ATP y de 2-oxoglutarato, indicadores del estado energético celular y la relación carbono/nitrógeno intracelular, respectivamente. El enzima NAGK, que interviene en uno de los pasos clave de la síntesis de arginina, es uno de los receptores de PII identificado en la cianobacteria *Synechococcus*. Se conoce a nivel molecular cómo la interacción de NAGK con PII resulta en la estimulación de la actividad de NAGK. La proteína PipX (P<sub>II</sub> Interacting Protein X), que actúa como coactivador de NtcA, es otro de los receptores de PII en *Synechococcus*. En este caso, no se conoce ni los residuos implicados en la interacción PII-PipX ni el significado funcional del complejo. Puesto que PipX no parece afectar los procesos o actividades relacionados con PII, es posible que PII pueda modular la interacción de PipX con NtcA.

Para conocer que residuos de PipX están implicados en la interacción con PII, estamos llevando a cabo dos estrategias complementarias: mutagénesis al azar y mutagénesis en residuos conservados de PipX. Pretendemos extender este análisis de interacción a la proteína NtcA, para entender si la unión de PipX a PII y NtcA implica o no los mismos residuos.

### Bibliografía

- 1) Espinosa J, Forchhammer K, Burillo S, Contreras A. Interaction network in cyanobacterial nitrogen regulation: PipX, a protein that interacts in a 2-oxoglutarate dependent manner with PII and NtcA. *Mol Microbiol.* 2006 Jul;61(2):457-69. Epub 2006 Jun 1.
- 2) Llácer JL, Contreras A, Forchhammer K, Marco-Marín C, Gil-Ortiz F, Maldonado R, Fita I, Rubio V. The crystal structure of the complex of PII and acetylglutamate kinase reveals how PII controls the storage of nitrogen as arginine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Nov 6;104(45):17644-9. Epub 2007 Oct 24.

## COORDINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA SÍNTESIS DE LIGNINA EN ÁLAMO (*Populus sp*)

Vanessa Castro-Rodríguez<sup>1</sup>, Francisco M. Cánovas<sup>2</sup> y Ángel García Gutiérrez-Fernandez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biología Molecular, Escuela de Biología, Universidad Industrial de Santander, AA 678, Bucaramanga, Colombia.

<sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga, 29071. Málaga. Spain.

En los últimos años los estudios en biología molecular en árboles han experimentado un gran desarrollo a pesar de los inconvenientes experimentales. Se están llevando a cabo diferentes proyectos genómicos y transcriptómicos, que están aportando valiosa información sobre la estructura, expresión y regulación de genes que participan en diferentes procesos metabólicos. Una de las principales áreas de investigación es la producción de madera, por su interés medioambiental en programas de reforestación, en retención de suelos, y por su interés industrial en la producción de celulosa y pulpa de papel (Gallardo et al. 2003). Según varios autores, el carbono necesario para la metilación de los monolignoles de la lignina procedería del ciclo C1, que a su vez lo obtendría de la descarboxilación de la Gly (Vander Mijnsbrugge et al. 2002; Cantón et al. 2005), mientras que el amonio liberado en la síntesis de los precursores de la lignina, sería reasimilado por el ciclo GS-GOGAT (Razal et al. 1996; van Heerden et al. 1996).

En el presente estudio, se llevó a cabo un análisis estructural y funcional de las secuencias génicas que codifican las enzimas que participan en las rutas metabólicas anteriormente mencionadas, en la especie arbórea *Populus sp* (chopo, álamo) cuyo genoma ha sido completamente secuenciado y se encuentra disponible en la base de datos del Joint Genome Institute JGI (<http://www.jgi.doe.gov/poplar>). Se realizaron alineamientos que permitieron identificar hipotéticas duplicaciones entre pares de genes localizados en diferentes posiciones, para cada familia. Estas duplicaciones se verificaron mediante rastreos de centenares de miles de bases de las secuencias codificantes de las regiones colindantes de los genes en estudio, y se realizaron alineamientos entre las secuencias codificantes detectadas, encontrando alta colinearidad en todos los casos estudiados. Se utilizó información procedente de la base de datos de ESTs de *Populus* del Umea Plant Science Centre UPSC, (<http://www.Populus.db.umu.se>) para llevar a cabo un northern electrónico, que permitió comprobando que muchos de los genes duplicados se expresaban diferencialmente, sugiriendo su divergencia funcional, especialmente en tejidos heterotróficos.

Por otra parte se colectó abundante información de las bases públicas de datos de microarrays, elaborados con clones procedentes de PopulusDB. Los datos obtenidos se sometieron a un análisis de correlación y de componentes principales, encontrando que la expresión de la mayor parte de los genes en estudio están probablemente coordinada durante la producción de lignina

### Bibliografía

- 1) Cantón FR, Suárez MF, Cánovas FM (2005) Molecular aspects of nitrogen mobilization and recycling in trees. *Photosynthesis Research* 83: 265-278.
- 2) Gallardo F, Fu J, Jing ZP, Kirby EG, Cánovas FM (2006) Genetic modification of amino acid metabolism in woody plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 587-594.
- 3) Razal R, Ellis S, Singh S, Lewis NG, Towers GHN (1996) Nitrogen recycling in phenylpropanoid metabolism. *Phytochemistry* 41 (1): 31-35.
- 4) Vander Mijnsbrugge K, Meyermans H, Montagu MV, Bauw G, Boerjan W (2002) Wood formation in poplar: identification, characterization, and seasonal variation of xylem proteins. *Planta* 210: 589-598.
- 5) Van Heerden PS, Neil Towers GS, Lewis NG (1996) Nitrogen Metabolism in Lignifying *Pinus taeda* Cell Cultures. *The Journal of Biological Chemistry* 271(21): 12350–12355.

## INTERACTION OF CARBON AND NITROGEN IN A C<sub>4</sub> PLANT (*Sorghum bicolor*)

Redouane EL OMARI<sup>1</sup>, Marina Rueda<sup>2</sup>, Remedios Crespillo Molina<sup>2</sup>, Concepción Avila<sup>2</sup>, Francisco M Cánovas<sup>2</sup> and Mohamed Nhiri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Biologie Appliquée, Faculté des Sciences et Techniques, Tanger principale BP 416, Maroc. <sup>2</sup>Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de ciencias, Universidad de Málaga, Campus de Teatinos s/n, 29071-Málaga.

*Sorghum bicolor* L. plants have a photosynthetic metabolism of C<sub>4</sub> type, that requires of aminotransferases enzymes such as aspartate aminotransferase (AAT). The recent discovery of a new AAT isoform (de la Torre, 2006) in C<sub>3</sub> plants and its possible presence in C<sub>4</sub> plants raise some questions on the biological role of this enzyme in the biosynthesis of essential amino acids and the efficient photosynthetic metabolism of these plants. The first part of this work consists in the identification of the AAT in photosynthetic cells of sorghum and our result showed that the enzyme is constituted by a sub-unit of 45 kDa immunologically similar to the enzymes of C<sub>3</sub> plants and gymnosperms, what suggests a high degree of conservation in higher plants. To investigate whether the expression of AAT is associated with the differentiation of leaves, we analysed the chlorophyll levels and AAT, GS, Fd-GOGAT, IDH, PEPC, RubisCo and NR contents in serial sections of the leaves. The chlorophyll content was high in the top section, indicating that chloroplast development takes place in the aged cells and then decreases toward basal section in a continuous gradient. The RubisCo and NR contents matched the pattern of chlorophyll in the leaves, high levels in the aged section and very low levels in the basal sections. In contrast to chlorophyll, RubisCo and NR contents, the pattern of GS2, Fd-GOGAT polypeptides markedly increased from the top to the basal sections of leaves sorghum. However the pattern of AAT, IDH and PEPC don't change in different sections. In second part of the work, plants of *Sorghum bicolor* were grown at different concentrations (0.5, 5, 20 and 50 mM) of nitrate or ammonium, and the growth, enzymes activities of assimilation de carbon and nitrogen (AAT, GS, Fd-GOGAT, IDH, PEPC, RubisCo and NR) were studied in plants roots and leaves for 30 days after germination. The total fresh weight changed between the NO<sub>3</sub><sup>-</sup>- and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-fed plants; at high levels of nitrate (20 and 50 mM) it was significantly higher, however Sorghum plants showed a greater growth at 5 mM and significant growth at 20 mM of ammonium.

The results will be presented and discussed with regard to carbon/nitrogen equilibrium, nitrogen use-efficiency and biomass production in C<sub>4</sub> plants.

This research was supported by funds of Programme AECI (A/5503/06)



## CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE UN FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN TIPO DOF EN *Pinus pinaster*.

S4-P4

**Aranzazu Flores, Marina Rueda, Remedios Crespillo, Concepción Ávila y Francisco Cánovas.**

*Universidad de Málaga, Facultad de Ciencias, Dpto. Biología Molecular y Bioquímica. Campus de Teatinos s/n 29071, Málaga. España*

La expresión de los genes está regulada por diferentes mecanismos, siendo el más importante de ellos el control transcripcional. Los factores de transcripción regulan los niveles de transcripción por interacción con otros factores o por unión a elementos reguladores cis de los promotores en sus genes diana. Los dominios de unión al ADN suelen estar muy conservados en la evolución, por ello, se usa para la clasificación en familias de los factores de transcripción. Algunas de estas familias son comunes para todos los organismos eucariotas pero otras son específicas de un grupo taxonómico. Una familia de factores de transcripción específico de plantas son los factores de transcripción tipo Dof (DNA-binding with One Finger). Los factores de transcripción Dof participan en procesos exclusivos de plantas como la asimilación de carbono y nitrógeno, en la regulación de genes de respuesta a la luz, en la acumulación de proteínas en la semilla, en la germinación, en la dormancia, en respuesta a fitohormonas, en la floración y en la expresión de genes de las células guarda, que representan adaptaciones importantes adquiridas a lo largo de la evolución.

Un análisis filogenético previo (Moreno y col., 2006) muestra que los Dof pueden agruparse en 6 grandes subfamilias de genes, ortólogos y parálogos, que probablemente se han originado de eventos de duplicación génica a partir de un clade parafilético basal.

Según nuestro estudio filogenético *PpDof 2* pertenece a la subfamilia G, lo que sugiere que podría haber surgido tras la duplicación del genoma de *Pinus pinaster* y haber sufrido un proceso de neofuncionalización (Ohno, 1970). Este tipo de evento ha sido descrito con anterioridad para otras familias de factores de transcripción (He and Zhang, 2005).

En este trabajo se discutirá la posible implicación funcional de *PpDof2* en la regulación de genes de glutamina sintetasa de pino.

### Bibliografía

- 1) Yanagisawa S (2002) Trends in Plant Science 7:555-560.
- 2) Moreno M. A, Martínez M, Vicente J, Carbonero P (2006) Mol. Genet. Genomics 277:379-390
- 3) Ohno S (1970) Evolution by Gene Duplication. Springer-Verlag, Heidelberg
- 4) He X, Zhang J (2005) Rapid subfunctionalization accompanied by prolonged and substantial neofunctionalization in duplicate gene evolution Genetics 169:1157-1164

## REGULACIÓN DE LA ISOCITRATO DESHIDROGENASA Y OTROS GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DEL CARBONO Y EL NITRÓGENO EN *PROCHLOROCOCCUS*

Antonio López Lozano, Guadalupe Gómez Baena, Oriol Alberto Rangel, Jesús Díez y Jose Manuel García Fernández

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Severo Ochoa, 1ª Planta. Campus de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba. b72lolof@uco.es*

*Prochlorococcus* es una cianobacteria marina que alcanza su máxima concentración en las zonas oligotróficas, siendo además responsable de un porcentaje significativo de la producción primaria global [1,2].

La isocitrato deshidrogenasa (ICDH) es una enzima clave para el estudio fisiológico de la interacción carbono/nitrógeno en cianobacterias. Puesto que este grupo de microorganismos presenta la particularidad de tener un ciclo de los ácidos tricarbóxicos incompleto, al carecer de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa, el 2-oxoglutarato producido por la ICDH se dirige mayoritariamente hacia la ruta glutamina sintetasa/glutamato sintasa (GS/GOGAT), proporcionando así el esqueleto carbonado que esta necesita para la asimilación de amonio [3].

En este trabajo se muestra el comportamiento *in vivo* de la ICDH de *Prochlorococcus* frente a diferentes condiciones de cultivo: ausencia de nutrientes, oscuridad y adición de inhibidores específicos de la ruta GS/GOGAT y la cadena de transporte fotosintético. Para ello, se han realizado medidas espectrofotométricas de actividad, y cuantificado la expresión del gen *icd*, codificante de esta enzima, mediante RT-PCR en tiempo real. Además, se ha completado el estudio con un análisis de la expresión de otros genes implicados en el metabolismo del nitrógeno y la regulación del mismo, como son los codificantes de la GS (*glnA*), GOGAT (*glsF*), NtcA (*ntcA*) y P<sub>II</sub> (*glnB*).

Nuestros resultados sugieren que efectivamente, el 2-oxoglutarato es la molécula utilizada por *Prochlorococcus* para percibir el balance carbono/nitrógeno intracelular, pero al mismo tiempo, confirman que el sistema regulador de la asimilación de nitrógeno en este microorganismo difiere del descrito en otras cianobacterias.

- 1) Partensky *et al.* (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 106-127.
- 2) Coleman y Chisholm (2007) *Trends Microbiol.* 15(9): 398-407.
- 3) Muro-Pastor *et al.* (2005) *Photosynth. Res.* 83(2): 135-150.

*Financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (MEC, BFU2006-10011/BMC), la Junta de Andalucía (JA, Proyecto de Excelencia P07-CVI-3055) y la Universidad de Córdoba (UCO, Programa Propio de Investigación). A.L.L. y G.G.B. recibieron un beca predoctoral del MEC y la JA, respectivamente O.A.R. recibió una beca de investigación de la UCO.*

## PAPEL DEL OXALACETATO Y SU CIANHIDRINA EN LA ASIMILACIÓN DE CIANURO EN *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Luque-Almagro V.M.<sup>1</sup>, Huertas M.J.<sup>1</sup>, Martínez-Luque M.<sup>1</sup>, Blasco R.<sup>2</sup>, Moreno-Vivián C.<sup>1</sup>, Castillo F.<sup>1</sup>, Roldán M.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Campus de Rabanales. Edificio Severo Ochoa. Universidad de Córdoba. <sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.

El cianuro es un compuesto de vital importancia en la biosfera debido a su implicación en la síntesis de moléculas orgánicas en la Tierra prebiótica (1), a su elevada toxicidad para muchos seres vivos y también debido a su capacidad de servir como nutriente para un gran número de microorganismos (2). En el caso de ser utilizado como nutriente, y teniendo en cuenta el estado de oxidación de sus componentes, el cianuro puede considerarse como una excelente fuente de nitrógeno comparable al amonio y al mismo tiempo una fuente de carbono pobre. Las diferentes rutas de degradación de cianuro se pueden clasificar en cuatro tipos: a) hidrolíticas, b) oxidativas, c) reductoras y d) de sustitución/adición (3).

*Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria alcalófila capaz de utilizar el cianuro como fuente de nitrógeno (4, 5). Resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación revelan que esta bacteria asimila cianuro a través de una ruta de degradación no descrita hasta el momento basada en dos procesos, uno químico y otro enzimático. En el primer paso el cianuro induce de forma específica la producción y liberación al medio de oxalacetato, el cual reacciona químicamente con el cianuro formando la cianhidrina correspondiente. Se ha observado que en células cultivadas con cianuro se inhiben algunas enzimas del ciclo de Krebs (aconitasa y fumarasa), mientras que algunas enzimas del ciclo del glioxilato presentan mayor actividad (citrato sintasa e isocitrato liasa), lo que indica que la producción de oxalacetato en estas células puede ser originada por el efecto del cianuro sobre estas dos rutas centrales. Una vez formada la cianhidrina, ésta es metabolizada por la bacteria a través de un sistema enzimático (nitrilasa o nitrilo hidratasa-amidasa) capaz de generar amonio.

Esta ruta degradativa presente en *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 constituye un nuevo y rápido proceso de asimilación de cianuro, por lo que su estudio detallado podría resultar de gran importancia para su aplicación en procesos de biorremediación.

Agradecimientos a la empresa Gemasur, S.L. y a los Proyectos MEC BIO2005-07741-CO2-01 y BIO2005-07741-CO2-02 y Junta de Andalucía (P06-CVI-01728 y CVI0117).

- 1) Mikawa S, Cleaves HJ, Miller SL (2002) The cold origin of life: A. Implications based on the hydrolytic stabilities of hydrogen cyanide and formamide. *Orig. Life Evol. Biosph.* **32**:195-208.
- 2) Dubey SK y Holmes DS (1995) Biological cyanide destruction mediated by microorganisms. *World J. Microbiol. Biotech.* **11**:257-265.
- 3) Ebbs S (2004) Biological degradation of cyanide compounds. *Current Opinion in Biotechnology* **15**:231-236.
- 4) Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Roldán MD, García-Gil J, Castillo F, Blasco R (2005) Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 940-947.
- 5) Luque-Almagro VM, Blasco R, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Castillo F and Roldán MD (2005) Alkaline cyanide biodegradation by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:168-169.

## RESÚMENES DE LA SESIÓN N5

*Aplicaciones agronómicas,  
industriales y medioambientales*

## CIANOTROFIA: BIODEGRADACIÓN Y ASIMILACIÓN DEL CIANURO Y SUS DERIVADOS POR *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

Moreno-Vivián C., Luque-Almagro V.M., Huertas M.J., Sáez L.P., Escribano M.P., Martínez-Luque M., Blasco R.\*, Roldán M.D., Castillo F.

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Edificio Severo Ochoa, Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba.*

*\*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Extremadura.*

El cianuro es un compuesto muy tóxico para la mayoría de los organismos, ya que inhibe las hemoproteínas que participan en los procesos respiratorios y otras metaloproteínas, como las implicadas en los procesos redox del ciclo del nitrógeno. La minería, la joyería, las industrias metalúrgicas y otras actividades humanas producen residuos con altas concentraciones de cianuro libre y complejo a metales, que resultan muy peligrosos y difíciles de tratar sin causar problemas medioambientales. A pesar de su toxicidad, el cianuro puede ser metabolizado por algunos microorganismos que transforman este compuesto en un producto asimilable. Además de una ruta metabólica para la degradación del cianuro, los microorganismos cianotróficos deben poseer diversos mecanismos que garanticen su supervivencia en presencia de este compuesto, como oxidasas alternativas que permitan una respiración insensible a cianuro, defensas antioxidantes específicas que eviten los daños por estrés oxidativo y sistemas de captación de hierro, como los sideróforos, que permiten a las células disponer de hierro aún cuando el cianuro forma complejos altamente estables con este metal. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria alcalófila autóctona que utiliza cianuro como única fuente de nitrógeno a pH alcalino, lo que evita su volatilización como HCN. También utiliza otros compuestos relacionados, como cianato, 3-cianoalanina, nitrilos y complejos estables cianuro-metal (1,2). Esta estirpe también produce sideróforos (3) y posee una oxidasa alternativa implicada en la resistencia a cianuro (4). El cianato es asimilado mediante una actividad cianasa, pero la degradación de cianuro requiere la producción de oxalacetato y la formación de su correspondiente cianhidrina, que es posteriormente metabolizada por una actividad nitrilasa o nitrilo hidratasa-amidasa que genera amonio. Además, se ha obtenido un mutante (RC5) que tolera concentraciones muy elevadas de cianuro y que produce de forma constitutiva altas concentraciones de oxalacetato. Estudios proteómicos mediante electroforesis bidimensional y MALDI-TOF-MS indican que el cianuro induce una compleja respuesta en la que participan proteínas relacionadas con la adquisición de hierro, el estrés oxidativo y la disponibilidad de nitrógeno (5). Por todas estas características, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* podría ser un excelente candidato para procesos biotecnológicos de degradación de los residuos cianurados industriales.

*Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (BIO2005-07741-CO2-01) y la Junta de Andalucía (CVI-117). También se agradece a la empresa GEMASUR S.L. su colaboración.*

1. Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Roldán MD, García-Gil J, Castillo F, Blasco R (2005). *Appl Environ Microbiol* **71**: 940-947.
2. Luque-Almagro VM, Blasco R, Huertas MJ, Martínez-Luque M, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD (2005). *Biochem Soc Trans* **33**: 168-169.
3. Huertas MJ, Luque-Almagro VM, Martínez-Luque M, Blasco R, Moreno-Vivián C, Castillo F, Roldán MD (2006). *Biochem Soc Trans* **34**: 152-155.
4. Quesada A, Guijo MI, Merchán F, Blázquez B, Igeño MI, Blasco R (2007). *Appl Environ Microbiol* **73**: 5118-5124.
5. Luque-Almagro VM, Huertas MJ, Roldán MD, Moreno-Vivián C, Martínez-Luque M, Blasco R, Castillo F (2007). *Environ Microbiol* **9**: 1541-1549.

## BIOENSAYO PARA DETECTAR LA NITRACIÓN DE PROTEÍNAS USANDO COMO DIANA LA FE-SUPERÓXIDO DISMUTASA DE COWPEA (*Vigna unguiculata*)

Estíbaliz Urarte<sup>a</sup>, Estíbaliz Larrainzar<sup>b</sup>, Idoia Ariz<sup>a</sup>, Aquilino Lantero<sup>a</sup>, Iñigo Auzmendi<sup>b</sup>, César Arrese-Igor<sup>b</sup>, Esther M. González<sup>b</sup>, and Jose F. Moran<sup>a\*</sup>

*Instituto de Agrobiotecnología, Universidad Pública de Navarra-CSIC-Gobierno de Navarra, Pamplona.*

*Departamento de Ciencias del Medio Natural, Universidad Pública de Navarra, Pamplona.*

El óxido nítrico (NO<sup>·</sup>) y sus derivados, como el anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) y otras especies reactivas de nitrógeno (RNS), tienen gran importancia en los sistemas biológicos, ya que pueden mediar en diferentes procesos como la regulación metabólica de genes, la homeostasis del Fe, desencadenar la defensa patogénica o así como intervenir en procesos patológicos en animales. En plantas la producción de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) es importante en determinados tejidos y procesos fisiológicos, y junto al NO<sup>·</sup> puede dar lugar al ONOO<sup>-</sup> que es un oxidante fuerte capaz de inactivar enzimas. En este trabajo describimos el uso de una Fe-superóxido dismutasa (Vu\_FeSOD) encontrada en nódulos de *cowpea* (*Vigna unguiculata*) como diana en bioensayos para detectar nitración mediada por ONOO<sup>-</sup>.

Para la producción de ONOO<sup>-</sup> utilizamos un generador artificial, el SIN-1, que genera de manera simultánea cantidades equimolares de NO<sup>·</sup> y O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Este sistema fue capaz de nitrar grupos -OH de tirosinas en la seroalbúmina bovina o BSA. La nitración fue detectada inmunquímicamente mediante el uso del anticuerpo policlonal anti-3-nitrotirosina. Esta hibridación "Western" indicó que la Vu\_FeSOD se nitraba de una manera dependiente de la concentración de SIN-1. En ausencia de SIN-1 no se detectó ninguna señal, mientras que el agente quelante de Fe desferrioxamina suprimió totalmente la nitración en la BSA, indicando la posibilidad de que trazas de Fe contaminantes estén contribuyendo al proceso.

El enzima Vu\_FeSOD recombinante se incubó del mismo modo con cantidades crecientes de SIN-1 y se detectaron niveles de 3-nitrotirosina. En este caso, la nitración no fue totalmente suprimida por desferrioxamina, y las bandas de la hibridación resultaron más nítidas y definidas que para BSA, indicando una mayor especificidad en el proceso de nitración. Asimismo, se midieron actividades SOD mediante ensayo en gel nativo y se estimó la pérdida de actividad mediante densitometría. Se observó también que la inactivación de la enzima fue dependiente de la concentración de SIN-1 por lo que este ensayo puede usarse para estimar la producción de ONOO<sup>-</sup>. Por otro lado, se analizó la actividad SOD total mediante el método espectrofotométrico basado en la habilidad de las SODs para inhibir la reducción del citocromo c férrico por parte del sistema xantina-xantina oxidasa. Este ensayo también permitió detectar la inactivación de la Vu\_FeSOD, y se confirmó que se daba gradualmente de una forma dosis-dependiente. Este método espectrofotométrico permite la cuantificación de la producción de ONOO<sup>-</sup>.

En conclusión, el uso *in vitro* de la Vu\_FeSOD recombinante puede permitir la estimación rápida en gel mediante análisis Western o mediante actividad SOD, del daño oxidativo causado por ONOO<sup>-</sup> o por sus precursores O<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sup>·</sup>, y/o su cuantificación espectrofotométrica.

### **Referencias:**

-“Use of Recombinant Iron-Superoxide Dismutase as a marker of nitrative stress”. Larrainzar E, Urarte E, Auzmendi I, Ariz I, Arrese-Igor C, Gonzalez EM, Moran JF. In: “Globins and other NO binding proteins, part B”. Methods in Enzymology. 2008. Vol. 437. Part B. In Press.

-“Método de cuantificación del daño o estrés oxidativo/nitrativo/nitrosativo”. Moran JF, Larrainzar E, Urarte E, Auzmendi I, González EM, Arrese-Igor C, Arnedo I. Universidad Pública de Navarra, 2007. N° de solicitud de patente: P200702035.

## ESTUDIO DEL ESTRÉS NUTRICIONAL POR AMONIO EN *Pinus pinaster* Ait. MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN DE GENÓMICA FUNCIONAL

Javier Canales<sup>1</sup>, Concepción Ávila<sup>1</sup>, David Pacheco<sup>1</sup>, Sara Díaz<sup>1</sup>, David Ariza<sup>2</sup>,  
Rafael M. Navarro<sup>2</sup>, Francisco R. Cantón<sup>1</sup>, María F. Suárez<sup>1</sup>, M.G. Claros<sup>1</sup>,  
Francisco M. Cánovas<sup>1</sup>

*Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga<sup>1</sup>. España*

*Departamento de Ingeniería Forestal, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Córdoba<sup>2</sup>. España*

Las especies forestales son de gran interés ecológico y económico. El nitrógeno es un elemento imprescindible para el crecimiento, desarrollo y supervivencia de estas plantas durante su largo ciclo de vida. Las coníferas son las especies forestales dominantes en los climas fríos de las latitudes altas y en las altas montañas de latitudes medias e incluso tropicales. Son especies capaces de resistir condiciones ambientales extremas tales como las bajas temperaturas, sequía y deficiencia de nitrógeno. Sin embargo, varios estudios indican que el crecimiento y supervivencia de estas plantas se ve influido de manera negativa por concentraciones relativamente bajas de amonio<sup>1</sup>. Por lo tanto, el aporte de este elemento a los bosques de coníferas como consecuencia de las actividades humanas podría ocasionar un daño importante en el medio ambiente.

El objetivo de este trabajo es la identificación de genes candidatos implicados en el metabolismo y estrés nutricional por nitrógeno. Como modelo experimental hemos elegido al pino marítimo (*Pinus pinaster* Ait.), que es la especie de mayor importancia en el sur de Europa (Francia, España y Portugal) donde representa alrededor de 4 millones de hectáreas. Además ya se disponen de numerosas herramientas a nivel molecular para estudiar esta especie.

Está bien documentado en la bibliografía que las coníferas, a diferencia de las plantas herbáceas, asimilan preferentemente amonio en lugar de nitrato como fuente de nitrógeno<sup>2</sup>. En este trabajo se cultivaron plantas de *P. pinaster* con diferentes concentraciones de amonio para identificar genes implicados en la respuesta al exceso/deficiencia de nitrógeno mediante la aplicación de métodos convencionales y de genómica funcional ("microarrays" y construcción de genotecas sustractivas). Algunos de estos genes se utilizaron como marcadores para explorar la variabilidad natural y los diferentes grados de tolerancia al amonio en distintas poblaciones naturales de *P. pinaster*.

Trabajo financiado por los proyectos BIO2006-06216 (Ministerio de Educación y Ciencia) y AGR663 (Junta de Andalucía).

### Bibliografía:

- 1) Öhlund J., Näsholm (2001). Growth of conifer seedlings on organic and inorganic nitrogen sources. *Tree Physiology* 21, 1319-1326.
- 2) Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass ADM (1997). Conifer root discrimination against soil nitrate and the ecology of forest succession. *Nature* 385:59-61.

## ACUMULACIÓN DE PROLINA Y EFICIENCIA EN EL USO DE AGUA EN CULTIVARES DE *Trifolium pratense* EN CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO

Casaretto E. <sup>(1)</sup>; Monza J. <sup>(1)</sup>; Márquez A. J. <sup>(2)</sup>; Rebuffo M. <sup>(3)</sup>; Díaz P. <sup>(1)</sup> y Borsani O. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Laboratorio de Bioquímica, Depto. de Biología Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República, Montevideo-Uruguay. <sup>(3)</sup> Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuaria (INIA) Estanzuela, Colonia-Uruguay. <sup>(2)</sup> Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular. Facultad de Química. Universidad de Sevilla. España.

El trébol rojo es una leguminosa forrajera con menor tolerancia a sequía que *Medicago sativa* y *Lotus corniculatus* (1). Entre las respuestas de las plantas a situaciones de déficit hídrico, la acumulación de prolina es una estrategia común en diferentes especies, aunque no es claro el rol de esta molécula, a la que se relaciona con el mantenimiento del potencial osmótico celular, defensa antioxidante y reserva de carbono y nitrógeno (2-3). La prolina ha sido usada como de respuesta a estrés, y el análisis de respuestas bioquímicas-fisiológicas frente a estrés hídrico puede ser útil para generar marcadores que asistan programas de mejoramiento. En este trabajo evaluamos, en dos cultivares de trébol rojo con diferente producción estival y origen genético, la síntesis y oxidación de prolina en relación a parámetros fotosintéticos, indicadores de tolerancia a estrés hídrico.

La concentración de prolina en folíolos, cuello y raíz de las plantas testigo fue la misma en los diferentes órganos, en ambos cultivares, aunque la conductancia estomática del cultivar INIA Mizar (M) fue inferior a la de Estanzuela 116 (E). Después de 4 días de suprimido el riego, la cantidad de agua en folíolos de M no varió, como tampoco la concentración de prolina. Este cultivar en condición control presentó menor conductancia estomática que E, lo que explica la no variación del contenido de agua. Sin embargo en E el contenido de agua bajó 50% y la concentración de prolina se incrementó de 3 a 27  $\mu\text{mol/gDW}$ . Un día después, en folíolos de M, cultivar con mayor producción estival de biomasa, el contenido de agua bajó 30% mientras que en E bajó 90%, y la concentración de prolina se incrementó de 4 a 70  $\mu\text{mol/gDW}$  y de 3 a 150  $\mu\text{mol/gDW}$  respectivamente. A partir de un descenso del contenido de agua del orden de 30% tanto en M como en E, la concentración de prolina en folíolos se hace constante, lo que hace a trébol rojo diferente al género *Lotus*, donde la prolina aumenta su concentración a lo largo de todo el período de déficit hídrico. El estudio de la acumulación de prolina en diferentes órganos mostró que el folíolo es el principal lugar de síntesis, y que la prolina se transloca a cuello y raíz en ambos cultivares.

La eficiencia en el uso del agua (WUE), evaluada como agua transpirada por biomasa producida y por discriminación isotópica del  $^{13}\text{C}$ , fue mayor en M que en E. Como se vio, en condiciones control, M tiene menor conductancia estomática que E, y cuando se establece el déficit hídrico M también presenta un menor descenso de la conductancia estomática. El cultivar M, con mayor producción de biomasa estival, presentó mayor WUE, lo que podría asociarse a una mayor tolerancia al déficit hídrico, característico de ese período. La acumulación de prolina fue útil para informar sobre el momento de establecimiento del estrés y su intensidad, y su concentración en diferentes órganos indicó que el folíolo acumula más que el cuello, y que se incrementa menos en raíz.

La rehidratación de las plantas condujo a contenidos de agua similares al control a las 4h en M y 8h en E. Esto se explicaría porque M al momento de la rehidratación tenía mayor contenido de agua respecto a E. También hubo diferencia entre los cultivares en la velocidad de oxidación de prolina, mientras en E a las 4h su concentración había descendido a la mitad, en M la concentración no varió. A las 24h la concentración de prolina igualó al valor del control, en ambos cultivares.

El hecho que M pierda menos agua y acumule menos prolina que E, sugiere que esta molécula no actúa como osmolito por lo que el mantenimiento del potencial osmótico celular en estos cultivares se debe a otras moléculas. Sin embargo WUE y conductancia estomática, parámetros relacionados entre sí, son indicadores de la respuesta adaptativa al déficit hídrico.

Agradecimientos: Proyectos LESIS (FTG 747/2005) y LOTASSA (FP6-2003-INCO-DEV2 PL-517617).

(1) Díaz P.; Borsani O. and Monza J. 2005. Lotus related species and their agronomic importance. In: *Lotus japonicus* Handbook. A. Márquez (Ed.). pp 25-37.

(2) Díaz P.; Borsani O.; Márquez A. and Monza J. 2005. Osmotically induced proline accumulation in *Lotus corniculatus* leaves is affected by light and nitrogen source. *Plant Growth Reg.* 46:223-232.

(3) Borsani O., Díaz P. and Monza J. 1999. Proline is involved in water stress responses of *Lotus corniculatus* nitrogen fixing and nitrate fed plants. *J. Plant Physiol.* 155:269-273.



## ESTUDIOS DE TERMOLUMINISCENCIA Y FLUORESCENCIA DE CLOROFILA EN PLANTAS DE *Lotus japonicus* SILVESTRES Y MUTANTES SOMETIDAS A ESTRÉS HÍDRICO.

**Margarita García-Calderón<sup>1</sup>, Pedro Díaz<sup>1,2</sup>, Mercedes Roncel<sup>3</sup>, J. M. Ortega<sup>3</sup>, Antonio J. Márquez<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>*Dpto. Bioquímica Vegetal y Biología Molecular, Facultad de Química, Universidad de Sevilla, Apartado 553, 41080-Sevilla, email: cabeza@us.es*

<sup>2</sup>*Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Avda. E. Garzón 780, CP 12900, Montevideo, Uruguay*

<sup>3</sup>*Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla-CSIC, Américo Vespucio 49, 41092-Sevilla.*

En nuestro laboratorio se han aislado mutantes fotorrespiratorios de la leguminosa modelo *Lotus japonicus* deficientes en la isoforma plastídica de la enzima glutamina sintetasa (GS). En trabajos previos, estos mutantes han sido caracterizados a nivel bioquímico y molecular (1, 2). En este trabajo se han examinado las posibles consecuencias del estrés hídrico y la deficiencia en GS plastídica en la fotosíntesis de las plantas, mediante estudios de fluorescencia de clorofila y bandas de termoluminiscencia (TL) y luminiscencia a altas temperaturas (HTL). La detección de emisiones características de termoluminiscencia (TL) se está utilizando recientemente como un indicador de cambios en el transporte fotosintético de electrones asociado al fotosistema II (3,4). Debido a que el PSII es un punto altamente sensitivo del aparato fotosintético y que se ve afectado por diversos factores medioambientales, la TL y fluorescencia de clorofila son poderosas herramientas para el estudio de los mecanismos de daño producidos por un gran número de estos factores (5). Las plantas de *L. japonicus* muestran modificaciones significativas de las bandas de TL y de los valores de Fv/Fm en condiciones de estrés hídrico, lo que parece indicar la existencia de alteraciones funcionales y/o estructurales en el PSII. Sin embargo no se detectaron cambios significativos en las bandas de HTL indicativas de peroxidación lipídica. La deficiencia en GS plastídica en los mutantes examinados provoca una disminución de la señal de fluorescencia al transferir las plantas a condiciones de fotorrespiración activa, que se agrava en condiciones de estrés hídrico, indicando la interconexión de la reasimilación de amonio fotorrespiratorio con la funcionalidad del PSII. Sin embargo, no se observaron en dichos mutantes alteraciones significativas de las bandas de TL y HTL.

1) Márquez, A.J., Betti, M., García-Calderón, M., Pal'ove- Balang, P., Díaz, P., Monza, J. (2005). *J. Exp. Bot.*, 56, 1741- 1749.

2) Betti, M.; Arcondéguy, T.; Márquez, A.J. (2006). *Planta*, 224, 1068-1079.

3) Inoue, Y. (1996). *Biophysical Techniques in Photosynthesis*, pp. 93-107.

4) Roncel, M.; Ortega, J.M. (2005). *Photosynth. Res.*, 84, 167-172.

5) Vass, I. (2003). *Photosynth. Res.*, 76, 303-318.

*Agradecemos la financiación proporcionada por la Unión Europea (proyecto INCO-DEV LOTASSA FP6-517617; MEC (BFU2005-3120) y Junta de Andalucía (Proyecto P07-CVI-03026).*

## AVANCES EN LA RESISTENCIA AL CIANURO Y EN EL METABOLISMO DE LA 3-CN-Ala POR *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344.

**Felipe Acera, M. Guijo, G. Gutiérrez, A. Quesada, R. Blasco.**

*Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética. Universidad de Extremadura.*

*Avenida de la Universidad sn,  
10071-Cáceres.*

La cepa CECT5344 de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* es capaz de crecer en medio mínimo a pH básico con elevadas concentraciones de cianuro como única fuente de nitrógeno. En esta comunicación se demuestra que los genes *cio*, que codifican el citocromo *bd*, son esenciales para el crecimiento con cianuro ya que este complejo corresponde a una oxidasa terminal de la cadena de transporte electrónico insensible al cianuro. Estos genes se agrupan en un operón de cinco genes que comienza con una nitrito o sulfito/reductasa (gen *sir/nir*). En este trabajo se describirán los datos obtenidos de la caracterización fenotípica mediante inactivación génica dirigida por recombinación homóloga de todos los genes del operón, así como el fenotipo observado tras su sobreexpresión heteróloga en *E. coli*.

Por otro lado, se está llevando a cabo la purificación de la enzima 3-ciano-alanina hidratasa (EC 4.2.1.65), que es una enzima que se detecta en extractos acelulares de células cultivadas con cianuro, pero no de células cultivadas con amonio o de medio LB. Esta enzima podría estar relacionada tanto con la detoxificación del cianuro como en su asimilación. Ha resultado revelador que, tras secuenciar el genoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344, se ha identificado corriente abajo del operón *cio*, y en su misma orientación de transcripción, varios genes que pueden estar implicados en el metabolismo de la 3-cianoalanina. Uno de los genes identificados corresponde a una 3-ciano-alanina nitrilasa que cataliza la transformación de su sustrato en amonio y ácido aspártico, ambos compuestos directamente utilizables por la bacteria. La enzima ha sido parcialmente purificada y caracterizada bioquímicamente. Los datos apuntan a que se trata de una enzima dodecamérica con una masa molecular de aproximadamente 440 kDa y con una  $K_m$  muy baja para la 3-cianoalanina. Resulta llamativo el hecho de que la enzima no cataliza la hidrólisis de la asparagina que es un posible intermediario en la reacción. Por el contrario, la asparagina parece ser un producto de la reacción, lo que sugiere un papel asimilador a la enzima en el metabolismo del cianuro.

**AGRADECIMIENTOS:** Los autores agradecen la financiación de los proyectos BIO2005-07741-C02-02, del Ministerio de Educación y Ciencia, y PRI07A097 de la Junta de Extremadura. Felipe Acera Hernández agradece al MEC la financiación de su trabajo mediante la beca FPI BES-2006-11941.

## ESTUDIO PROTEÓMICO Y APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DE LA BIODEGRADACIÓN DE CIANURO POR *Pseudomonas Pseudoalcaligenes* CECT5344

Huertas M.J.,<sup>1</sup> Luque-Almagro V.M.,<sup>1</sup> Escribano M.P.,<sup>1</sup> Martínez-Luque M.,<sup>1</sup> García I.,<sup>2</sup> Blasco R.,<sup>3</sup> Moreno-Vivián C.,<sup>1</sup> Roldán M.D.,<sup>1</sup> Castillo F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Severo Ochoa.  
<sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Química. Edificio Marie Curie. Universidad de Córdoba.  
<sup>3</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética. Universidad de Extremadura.

El cianuro es un compuesto que se encuentra frecuentemente en aguas residuales procedentes de industrias mineras y metalúrgicas y otras, como las de joyería y bisutería. El cianuro es muy tóxico para los seres vivos debido a que forma complejos muy estables con cofactores metálicos de proteínas y enzimas que son vitales. De acuerdo con la normativa vigente los residuos que contienen cianuro son calificados como tóxicos y peligrosos por lo que debe quedar regulada su gestión, de manera especial. La importancia local de la industria joyera ha propiciado el desarrollo de líneas de investigación en la Universidad de Córdoba sobre la depuración de aguas residuales procedentes de los numerosos talleres existentes en la ciudad. El residuo, derivado de estas actividades, contiene una concentración media de 20 g de cianuro libre por litro y además cianuro complejo con metales, con los que este compuesto forma complejos de toxicidad variable. Para llevar a cabo el tratamiento biológico de estos residuos se aisló una bacteria autóctona alcalófila que degrada cianuro libre y algunos de sus complejos metálicos como fuente de nitrógeno y que se clasificó como *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344. El estudio y caracterización de la biodegradación de cianuro por parte de esta estirpe se ha abordado desde diferentes aspectos. Uno de ellos, el estudio del proteoma de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en respuesta a cianuro ha permitido identificar proteínas relacionadas con resistencia a cianuro, biosíntesis de sideróforos y respuesta a estrés general. El otro aspecto incluye el estudio en biorreactores de las condiciones óptimas de crecimiento y biodegradación de cianuro. Estos experimentos resultan muy prometedores para el uso de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 en la eliminación de residuos cianurados mediante tratamiento biológico, como alternativa biotecnológica al tratamiento químico.

Agradecemos la colaboración de la empresa GEMASUR. Financiado por el MEC (proyectos BIO2005-07741-C02-01 y BIO2005-07741-C02-02) y la Junta de Andalucía (P06-CVI-01728 y Grupo CVI 0117)

- 1) Luque-Almagro V.M., Huertas M.J., Martínez-Luque M., Moreno-Vivián C., Roldán M.D., García Gil J., Blasco R. y Castillo F. (2005). Appl. Environ. Microbiol. 71, 940-947
- 2) Luque-Almagro V.M., Blasco R., Huertas M.J., Martínez-Luque M., Moreno-Vivián C. y Castillo F., (2005). Biochem. Soc. Trans. 172-173.
- 3) Huertas M.J., Luque-Almagro V.M., Martínez-Luque M., Blasco R., Moreno-Vivián C., Castillo F., y Roldán M.D. (2006). Biochem. Soc. Trans. 152-155.
- 4) Luque-Almagro VM, Huertas M.J., Roldán M.D., Moreno-Vivián C., Martínez-Luque M, Blasco R. y Castillo F. (2007). Environ. Microbiol. 1541-1549.

## EFECTO DEL MANEJO DE LA FERTILIZACIÓN NITROGENADA SOBRE LA SENESCENCIA EN PLANTAS DE TRIGO.

**Teresa Fuertes de Mendizábal<sup>(1)</sup>, Azucena González<sup>(1)</sup>, Angel M<sup>a</sup> Zamarreño<sup>(2)</sup>, José M<sup>a</sup> García-Mina<sup>(2)</sup>, José M<sup>a</sup> Estavillo<sup>(1)</sup>, M<sup>a</sup> Begoña González-Moro<sup>(1)</sup>**

<sup>(1)</sup> *Dpto Biología Vegetal y Ecología, UPV-EHU, Apdo 644, 48080 Bilbao.* <sup>(2)</sup> *Inabonos SA- Grupo Roullier, Polígono Arazuri-Orcoyen, C/C, nº 32, 31160 Orcoyen (Navarra).*

La senescencia foliar representa el estadio final de desarrollo de la hoja y se caracteriza por la transición de la asimilación de nutrientes a la removilización de los mismos <sup>(1)</sup>. La removilización y transferencia de los asimilados acumulados en las partes vegetativas hacia la semilla en especies monocárpicas requiere de la iniciación de la senescencia a nivel de la planta entera <sup>(2)</sup>. Los cereales muestran un tipo de senescencia monocárpica secuencial, donde las hojas se van muriendo en orden desde la base hacia el ápice a través de un proceso altamente organizado que sigue un patrón general que no cambia, pero cuya velocidad puede verse modificada por las condiciones ambientales <sup>(3)</sup>, el estatus nitrogenado y las relaciones fuente-sumidero. Diferentes experimentos han revelado la existencia de distintas señales relacionadas con el inicio y regulación de la senescencia, como los niveles hormonales, en concreto de citoquininas <sup>(4)</sup>, señales desde el sumidero en desarrollo <sup>(5)</sup> o determinados cambios en los niveles de fotosintetizados y otros metabolitos <sup>(6)</sup>. Las plantas tienen la habilidad de detectar el estatus nitrogenado tanto externo como interno, y de adaptarse a las condiciones cambiantes de disponibilidad de N modificando la expresión génica, las actividades enzimáticas y el contenido de los diferentes metabolitos, proveyéndose así de una red de regulación y de transducción sensorial eficiente e integrada <sup>(7)</sup>. Durante la senescencia los cambios que se inducen en el patrón de distribución de metabolitos y actividades enzimáticas, y la velocidad e intensidad de estos cambios, en respuesta a la disponibilidad de N, convierten a esos parámetros en marcadores potenciales para la determinación del estatus nitrogenado y/o el grado de senescencia. Se estableció un ensayo de campo con trigo de la variedad Soissons en secano donde se aplicaron dosis crecientes de fertilizante nitrogenado, fraccionadas en dos ó tres aportes, y donde se evaluó la potencialidad de diferentes parámetros como marcadores de senescencia y del estatus nitrogenado. Se comprobó que los niveles de citoquininas, especialmente los de *trans*-zeatina y *trans*-zeatin ribósido, y los niveles de expresión de la enzima Rubisco y de la enzima glutamina sintetasa resultaron buenos marcadores de senescencia y del estado nutricional de las plantas, permitiendo discriminar entre tratamientos fertilizantes con distinta dosis y llegando incluso a discriminar el fraccionamiento de una misma dosis en dos o en tres aportes. Del mismo modo, el estudio de los parámetros morfométricos foliares a través de cortes histológicos pertenecientes a estadios avanzados de madurez permitían discriminar el grado de senescencia y el estatus nitrogenado tanto entre los tratamientos sometidos a distintas dosis de fertilizante como a un distinto fraccionamiento de la misma dosis.

- 1) Hörtensteiner S, Feller U (2002) *J. Exp. Bot.* 53:927-937.
- 2) Yang J, Zhang J (2006) *New Phyt.* 169:223-236.
- 3) Borghi B (1999) Satorre EH, Slafer GA (eds.), *Wheat: Ecology and physiology of yield determination*. Food Products Press, New York, pp. 67-77.
- 4) Noodén LD *et al.* (1990) *Plant Physiol.* 93:33-39.
- 5) Gan S, Amasino RM (1995) *Science* 270:1966-1967.
- 6) Quirino B *et al.* (2000) *Trends Plant Sci.* 5 (7):278-290.
- 7) Sakakibara H (2006) *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:431-449.

Este trabajo de investigación ha recibido financiación del Gobierno Vasco a Grupos Consolidados de Investigación de Alto Rendimiento (UPV118.310-G07/2001) y del Ministerio de Educación y Ciencia (INIA RTA 2005-00219-C03-02). Teresa Fuertes ha disfrutado de una Beca Predoctoral para la formación de Investigadores del Gobierno Vasco (2003/2007).

## ESTRATEGIAS PARA EL ESTUDIO DEL GENOMA DE *P. pinaster*

**Rocío Bautista, David Pacheco, Sara Díaz-Moreno, F. R. Cantón, F. Cánovas, M. Gonzalo Claros**

*Dpto. Biología Molecular y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga*

Las plantas se encuentran entre los organismos que presentan los genomas de mayor tamaño entre los eucariotas, esta gran cantidad de ADN no contribuye al aumento de su complejidad, además, un alto porcentaje de ese ADN no parece contener información. La secuenciación del genoma de algunas especies de angiospermas en los últimos años ha vertido algo de luz sobre sus características y su estructuración, sin embargo, se conoce muy poco sobre las características y la organización del genoma de las plantas gimnospermas. El pino es una de las especies más importantes dentro de las gimnospermas y se ha adoptado como modelo experimental. Esta especie posee uno de los genomas más grandes que se pueden encontrar entre las plantas con un tamaño de 23.000 Mb, doscientas veces más grande que el de *Arabidopsis* y siete veces más grande que el de los humanos. Para poder caracterizar el genoma del pino, como modelo de estudio en gimnospermas, necesitamos disponer de una genoteca genómica completa, sin embargo, el gran tamaño y la complejidad de su genoma hace que esta tarea sea muy complicada. El disponer de este tipo de genotecas nos permitirá estudiar la organización del genoma del pino, pudiendo identificar los genes implicados en rutas tan importantes como son el metabolismo del nitrógeno o la producción de lignina y celulosa. El desarrollo de los vehículos artificiales ha facilitado el estudio de los genomas complejos, ya que son capaces de mantener de forma estable fragmentos de centenas de kilobases. En este trabajo hemos optimizado un método para la construcción de una genoteca genómica en BAC de *P. pinaster*. La genoteca parcial está constituida por 72.192 clones con un tamaño medio de inserto del 107 kb, presentando un 1.59 % de clones con ADN cloroplastídico y un 1,6 % de clones sin inserto. Con estas características, necesitaríamos 664.647 clones para disponer de una copia completa del genoma, datos poco manejables para laboratorios pequeños, por lo que cuando se trabaja con organismos con genomas tan grandes y complejos se ha optado por construir genotecas en BAC enriquecidas en secuencias codificantes aplicando distintas aproximaciones: un filtro de metilación, aislando la fracción de ADN de copia simple o aislando cromosomas. Sin embargo, hemos demostrado que las estrategias encaminadas hacia este fin no han mostrado resultados satisfactorios cuando el material vegetal de partida es el pino. Una forma diferente de organizar y almacenar los clones BAC sería una salida hacia una genoteca manejable, la construcción de genotecas organizadas en grupos de células se ha mostrado el camino más correcto. Hemos optimizado y validado un método para construir una genoteca organizada en grupos de célula en pino y que, por el momento, está formada por 83 grupos distintos que equivalen a 332.000 clones con un tamaño medio de inserto de 107 kb, un 0,5X de su genoma. El rastreo de las dos genotecas construidas con genes de interés para nuestro laboratorio nos ha permitido identificar distintos clones BAC que presentan señal positiva para la Fd-GOGAT, la proteína PII y para una quitinasa de clase I (ELP), además, hemos identificado secuencias codificantes en los clones con señal para la Fd-GOGAT y para la ELP. Durante este proceso hemos seleccionado las herramientas bioinformáticas adecuadas para los estudios de genomas complejos. La suma del resultado del rastreo de las dos genotecas construidas más el análisis de homología de las secuencias contenidas en los clones BAC muestra que a lo largo del genoma se encuentran esparcidas distintas copias de secuencias homólogas a Fd-GOGAT, además, hemos comprobado que en el gen de la Fd-GOGAT los sitios de ajuste se encuentran conservados en distintas especies de plantas, pareciendo que los organismos con genomas más grandes tienden a poseer genes con intrones más grandes. En definitiva, hemos desarrollado un método que facilita el estudio de genomas tan complejos como el que presenta el pino, este método ayudará, en un futuro cercano, el trabajo sobre los estudios del genoma de las gimnospermas.

## EFFECTO DE LA DOSIS Y LA FUENTE DE NITRÓGENO SOBRE LA COMPOSICIÓN ISOTÓPICA DE PLANTAS DE PIMIENTO

P. Flores<sup>1</sup>, P. Murray<sup>2</sup>, MM. Davó<sup>1</sup>, A. López<sup>1</sup>, E. Herrera<sup>1</sup>, P. Hellín<sup>1</sup>, J. Fenoll<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Dpto. de Calidad y Garantía Alimentaria, IMIDA, Estación Sericícola, 30150 La Alberca, Murcia, SPAIN; <sup>2</sup>Cross-Institute Programme for Sustainable Soil Function, North Wyke Research, Okehampton, Devon, EX20 2SB, UK

Una de las aplicaciones del análisis de la abundancia natural de isótopos estables de N ( $\delta^{15}\text{N}$ ), es la estimación de la contribución relativa de diferentes fuentes de N a un sumidero común. En plantas, las diferencias en los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  entre fertilizantes de origen orgánico y de síntesis o procedentes de la fijación de  $\text{N}_2$  atmosférico, pueden ser utilizadas para estimar la contribución de dichas fuentes al contenido de N de la planta. Sin embargo, la interpretación de los valores de la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$  en planta es complicada, debido a la discriminación isotópica asociada a los diferentes procesos de transformación del N, que pueden resultar en un fraccionamiento isotópico entre la fuente de N utilizada y la planta, así como entre las diferentes partes de la planta. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la dosis y la fuente de N sobre la composición isotópica de plantas de pimiento, como parte de un estudio más general, en el que se pretende optimizar una metodología basada en el análisis de la abundancia natural de  $^{15}\text{N}$ , para detectar fraudes en agricultura ecológica. Para ello se cultivaron plantas de pimiento en cámara de cultivo (16/8 h, 25/15 °C y 60/80 % HR día/noche) con diferentes dosis de  $\text{NO}_3^-$  (0, 1, 3 y 7 mM) y diferentes fuentes de N (0/100, 50/50 y 100/0  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ ) durante 50 días. Después de separar la planta en parte aérea y raíz, se determinó el peso fresco y seco de cada parte, así como el contenido de N-total y los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  de la planta y el suelo. En plantas cultivadas con  $\text{NO}_3^-$  como única fuente de N, el fraccionamiento isotópico a nivel de planta entera fue despreciable y el aumento de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  en planta, como consecuencia del incremento de la dosis de N, correspondió con la cantidad de fertilizante aplicada y con su valor de  $\delta^{15}\text{N}$ . En plantas cultivadas con  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  (en proporción 50:50) o exclusivamente con  $\text{NH}_4^+$ , los valores teóricos de  $\delta^{15}\text{N}$  en planta, calculados a partir de los valores de las plantas control (sin fertilizar) y de los fertilizantes aplicados, difirieron de los valores de  $\delta^{15}\text{N}$  reales, probablemente debido a una mayor contribución del fertilizante nítrico o del suelo respecto al fertilizante amónico. Para todos los tratamientos se observó un fraccionamiento entre la parte aérea y la raíz, atribuido a la discriminación entre isótopos durante la asimilación de N en la raíz.

## SOLUTOS COMPATIBLES NITROGENADOS VS. CARBONADOS EN LA ADAPTACIÓN AL ESTRÉS SALINO DE *LOTUS JAPONICUS* EN SIMBIOSIS CON *MESORHIZOBIUM LOTI*

**Miguel López y Carmen Lluch**

*Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. Campus de Fuentenueva s/n 18071 Granada (Spain)*

La salinidad es uno de los factores ambientales que más limita el crecimiento de las plantas, calculándose que aproximadamente afecta al 20% de la tierra cultivable en el mundo y al 40% de la irrigada (Sahi et al., 2006). Como mecanismo de defensa frente al estrés osmótico provocado por la salinidad, las plantas sintetizan moléculas que no interfieren con el metabolismo de la célula, aunque se encuentren en elevadas concentraciones, y que se denominan solutos compatibles. Estas moléculas intervienen en el mantenimiento de la presión de turgor y en la estabilización de proteínas y estructuras de la célula. Entre los solutos compatibles, se encuentran tanto carbohidratos como aminoácidos y otras moléculas nitrogenadas. Varios estudios fisiológicos han sugerido que en condiciones de estrés salino, carbohidratos no estructurales como la sacarosa, trehalosa o polioles se acumulan en diferente grado según las especies vegetales (Ashraf y Harris 2004). Entre los principales solutos compatibles que contribuyen al ajuste osmótico en plantas sujetas a estrés salino, los aminoácidos juegan un papel fundamental, habiéndose detectado un incremento significativo en su concentración en respuesta a este estrés (Mansour 2000). Entre los aminoácidos, la prolina es probablemente el osmolito más ampliamente distribuido, habiéndosele atribuido otras funciones como la regulación de la acumulación de nitrógeno en condiciones de estrés.

El objetivo de este trabajo es evaluar el papel de carbohidratos y aminoácidos como solutos compatibles en hojas y nódulos de plantas de *L. japonicus* inoculadas con *Mesorhizobium loti* en condiciones de estrés salino, para ello, las plantas en fase de crecimiento vegetativo, cuando la simbiosis estaba establecida, fueron sometidas a una dosis 50 mM NaCl, realizándose muestreos a los 14, 21 y 28 días de tratamiento. Entre los carbohidratos analizados, resulta de especial interés la trehalosa, debido a que es un disacárido poco abundante en plantas superiores, habiéndose relacionado su presencia con la interacción planta-microorganismo y la adaptación a diferentes estreses abióticos. De los carbohidratos analizados, el pinitol fue el mayoritario en hoja donde su concentración se duplicó por efecto de la salinidad a los 14 y 21 días de tratamiento. Por el contrario, la sacarosa fue el azúcar mayoritario en nódulos, multiplicándose por 6 en condiciones de salinidad del mismo modo que el pinitol. La trehalosa, como se esperaba presentó una mayor concentración en nódulos respecto a hojas, experimentando junto con la sacarosa y el pinitol un mayor incremento por efecto de la sal en nódulos. Sin embargo, las plantas de *L. japonicus* en condiciones de estrés salino, no solo acumularon carbohidratos, sino que también participaron compuestos nitrogenados en el ajuste osmótico, siendo la prolina el soluto cuya concentración aumentó en mayor medida en hojas por efecto de la sal al multiplicarse por 23 a los 14 días de tratamiento. En nódulo, el contenido de prolina mostró un comportamiento similar al de los carbohidratos mayoritarios en condiciones de salinidad. En general, se detecta una mayor acumulación de solutos compatibles carbonados en nódulo junto con una menor inhibición de la actividad nitrogenasa a los 14 días de tratamiento salino, confirmando así el papel beneficioso de éstos sobre el metabolismo nodular. Por el contrario, la prolina fue el osmolito que aumentó su concentración por la salinidad en mayor medida en hoja en cada uno de los tiempos de experimentación.

### Bibliografía

- 1) Sahi C, Singh A, Blumwald E, Grover A (2006) Beyond osmolytes and transporters: novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data. *Physiol Plant* 127: 1-9
- 2) Ashraf M, Harris PJC (2004) Potential indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci* 166: 3-16
- 3) Mansour MMF (2000) Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biol Plant* 43: 491-500

Este trabajo ha sido realizado con financiación del proyecto del Ministerio de Ciencia y Tecnología ref. BOS2002-04182-C02-02 y por el PAI de la Junta de Andalucía (Grupo AGR-139).

## **NbIR: UN REGULADOR DE LA RESPUESTA ATÍPICO IMPLICADO EN EL PROCESO DE CLOROSIS EN *Synechococcus* sp. PCC7942.**

**Lopez-Redondo M<sup>1</sup> ; Ruiz D<sup>2</sup>; Salinas P<sup>2</sup>; Contreras A<sup>2</sup> ;Marina A<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Unidad de Cristalografía de Macromoléculas. IBV-CSIC. 46010 Valencia. [amarina@ibv.csic.es](mailto:amarina@ibv.csic.es). <sup>2</sup>Dpto. Fisiología, Genética y Microbiología. Universidad de Alicante.03690 San Vicente del Raspeig, Alicante. [contrera@ua.es](mailto:contrera@ua.es) .

Las cianobacterias responden a ciertas condiciones de estrés por nutrientes o luz a través de la degradación de los complejos antena de su aparato fotosintético, un proceso denominado clorosis. Tanto en estos organismos como en el resto de procariotas, los sistemas de transducción de señal más importantes implican al menos dos proteínas; un sensor con actividad histidina quinasa (HK) y un regulador de la respuesta (RR) que generalmente es un factor de transcripción. La transducción de la señal en estos sistemas, denominados de dos componentes, se realiza por la autofosforilación de la HK en un residuo de histidina conservado y la posterior transferencia del grupo fosforilo a un residuo de aspártico del RR que inducen cambios conformacionales, habitualmente dimerización, que desencadenan la respuesta celular. En *Synechococcus*, dos proteínas que juegan un papel fundamental en la adaptación a los cambios ambientales son la HK NbIS y el RR NbIR. Su implicación en procesos comunes ha postulado que ambas proteínas podrían formar un sistema de dos componentes que regularía procesos de aclimatación a estrés.

En el presente trabajo se mostrarán ensayos *in vitro* donde se pone de manifiesto que NbIR es un RR atípico, al no presentar elementos estructurales esenciales para fosforilarse. Es más, nuestros ensayos muestran que NbIR no puede ser fosforilado *in vitro* utilizando el fosfodoador acetil fosfato o por la HK NbIS. Ensayos de entrecruzamiento y gel filtración muestran que NbIR es monomérica. Estos resultados apuntan a que la interacción directa proteína-proteína entre NbIS-NbIR parece muy poco probable y que NbIR debe seguir un proceso de activación alternativo.



## RELACIÓN ENTRE RESISTENCIA Y ASIMILACIÓN DE CIANURO EN *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344.

Faustino Merchán, M<sup>a</sup> Isabel Igeño, Rafael Blasco.

*Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Genética.  
Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura.  
Avenida de la Universidad SN.  
10071-Cáceres.*

*Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344 es una bacteria alcalófila capaz de utilizar cianuro como única fuente de nitrógeno y ello la hace susceptible de ser utilizada para eliminar el cianuro presente en algunos residuos industriales.

El cianuro es una molécula muy simple y su transformación en amonio sencilla desde un punto de vista químico, pero su toxicidad hace que las bacterias que lo degraden necesiten desarrollar mecanismos de resistencia específicos. Entre estos mecanismos se encuentra una respiración aeróbica resistente a cianuro que se induce en medios con cianuro.

El medio de cultivo contiene acetato como fuente de carbono y cianuro como fuente de nitrógeno. El acetato se asimila mediante el ciclo del glioxilato, pero la regeneración de oxalacetato requiere la oxidación del malato.

Extractos acelulares de células cultivadas con cianuro como fuente de nitrógeno, pero no de células cultivadas con amonio, catalizan la desaparición de cianuro a partir de fumarato y L-malato. Fumarato y malato se encuentran en equilibrio en una reacción catalizada por la fumarasa, pero el responsable de la desaparición de cianuro es el malato.

En esta bacteria el L-malato es un donador directo de electrones a la cadena de transporte electrónico mediado por una malato-quinona oxidoreductasa de membrana que cataliza la formación de oxalacetato a partir de malato. El oxalacetato es sustrato de una descaboxilasa que lo transforma a su vez en piruvato. Ambos cetoácidos, oxalacetato y piruvato, reaccionan con el cianuro produciendo cianohidrinás, que son metabolitos asimilables por la bacteria.

En resumen, la asimilación de cianuro en la cepa CECT5344 parece encontrarse muy relacionada con la resistencia, ya que únicamente cuando se induce la respiración resistente a cianuro se pueden producir cetoácidos en presencia de cianuro, y por lo tanto cianohidrinás. La ruta mediante la cual la bacteria asimila las cianohidrinás es una cuestión que todavía no ha sido aclarada.

**AGRADECIMIENTOS:** Los autores agradecen la financiación de los proyectos BIO2005-07741-C02-02, del Ministerio de Educación y Ciencia y PRI07A097 de la Junta de Extremadura.

## EFFECTOS TÓXICOS DEL ARSÉNICO SOBRE LA INTERACCIÓN SIMBIÓTICA MODELO *Sinorhizobium meliloti-Medicago*

**E. Pajuelo, I.D. Rodríguez-Llorente, M. Dary, A.J. Palomares (\*)**

*Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González, 2, 41012, Sevilla*

(\*) *In memoriam*

La contaminación ambiental con arsénico está asociada principalmente con la actividad minera, pero este elemento tiene además un amplio uso industrial (por ejemplo la fabricación de ordenadores o los fuegos artificiales). La interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosa se ha utilizado tradicionalmente como un sistema eficiente para el enriquecimiento en nitrógeno de los suelos y, recientemente, se ha propuesto como una herramienta interesante para la biorremediación de suelos contaminados. Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto de los contaminantes más habituales en el proceso de nodulación de las plantas leguminosas. En este trabajo hemos examinado los efectos fitotóxicos del arsénico en la nodulación de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*), utilizando la cepa de *Sinorhizobium meliloti* MA11 marcada con el gen informador *lacZ*. Esta cepa tiene una alta tolerancia a As y excelentes características simbióticas (efectividad, competitividad...). Mientras que la bacteria creció en placas con concentraciones de As de hasta 10mM, concentraciones mucho menores de As (25 to 35µM) hicieron disminuir hasta el 25% el número total de nódulos en la planta, debido a una reducción en el número de infecciones cercana al 90%. El efecto observado está asociado a un daño en los pelos radiculares y a la presencia de una menor zona infectiva en la raíz. Sin embargo, una vez que se estableció la simbiosis, el desarrollo del nódulo continuó de forma normal, aunque se pudo observar una senescencia más temprana en los nódulos de las plantas que crecieron en presencia de As. Se describe además cómo se ven influenciados por el As algunos parámetros de crecimiento de la planta. Actualmente estamos llevando a cabo un estudio molecular para ver qué posibles genes marcadores de las diferentes etapas del proceso de nodulación podrían estar implicados en la disminución del número de nódulos.

## PAPEL DE LA NITRORREDUCTASA NprA DE *Rhodobacter capsulatus* EN LA BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS

Roldán M.D.<sup>1</sup>, Pérez-Reinado E.<sup>1</sup>, Castillo F.<sup>1</sup>, Moreno-Vivián C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Edificio Severo Ochoa, 1ª Planta, Campus de Rabanales. Universidad de Córdoba. 14071-Córdoba

La bacteria fotosintética *Rhodobacter capsulatus* posee los genes *nprA* y *nprB* que codifican las nitrorreductasas NprA y NprB, respectivamente (1). Estas proteínas son flavoenzimas que utilizan NAD(P)H como donador fisiológico de electrones y catalizan la reducción de uno o varios grupos nitro de diferentes compuestos nitroaromáticos y nitroheterocíclicos (2, 3). Los genes que codifican posibles nitrorreductasas están presentes en la mayoría de genomas bacterianos y también se encuentran en Archaea y Eucariota (4). En las últimas décadas se han descrito numerosas aplicaciones biotecnológicas y biomédicas de las nitrorreductasas destacando la biorremediación de nitroaromáticos por compostaje, la fitorremediación usando plantas transgénicas portadoras de nitrorreductasas y los tratamientos de determinados procesos tumorales (5, 6). La nitrorreductasa NprA de *Rhodobacter capsulatus* se ha hiperexpresado en *Escherichia coli* como proteína recombinante fusionada a una cola de seis histidinas, lo cual ha permitido su purificación hasta homogeneidad mediante el uso de columnas NTA-Ni<sup>2+</sup>. La proteína His<sub>6</sub>-NprA presenta actividad nitrorreductasa con NADPH como donador fisiológico de electrones y utiliza numerosos sustratos, tales como 2,4-dinitrofenol, ácido pícrico y furazolidona. La actividad nitrorreductasa más elevada de His<sub>6</sub>-NprA se ha obtenido usando la forma quinonoide de la 6,7-dimetil-7,8-dihidropterina. Además, una estirpe mutante de *R. capsulatus* deficiente en el gen *nprA* crece mejor con Phe o Tyr como fuente de nitrógeno que la estirpe silvestre (7). Por otro lado, estudios de expresión génica demuestran que el gen *nprA* se induce por aminoácidos aromáticos y no por aminoácidos no aromáticos. Estos resultados sugieren que la nitrorreductasa NprA de *Rhodobacter capsulatus* actúa *in vivo* como una dihidropteridina reductasa implicada en el metabolismo de aminoácidos aromáticos.

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos del MEC BIO2005-07741-CO2-01 y Junta de Andalucía (CVI 0117).

- 1) Pérez-Reinado E, Blasco R, Castillo F, Moreno-Vivián C, Roldán MD (2005). *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7643-7649.
- 2) Roldán MD, Pérez-Reinado E, Castillo F, Moreno-Vivián C (2008). *FEMS Microbiol. Rev.* En prensa.
- 3) Rieger P-G, Meier H-M, Gerle M, Vogt U, Groth T, Knacknuss H-J (2002). *J Biotech.* 94: 101-123.
- 4) Marques de Oliveira I, Pêgas Henriques JA, Bonatto D (2007). *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 355: 919-925.
- 5) Ramos JL, González-Pérez MM, Caballero A, van Dillewijn P (2005). *Curr Opin Biotechnol.* 16: 275-281.
- 6) Knox RJ, Connors TA (1997). *Pathol. Oncol. Res.* 3: 309-324.
- 7) Pérez-Reinado E, Roldán MD, Castillo F, Moreno-Vivián C (2008). *Environ. Microbiol.* En prensa.

**FOSFORILACIÓN Y OTROS MECANISMOS DE ACTIVACION EN  
LA TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES DE ESTRÉS MEDIADA POR  
LOS REGULADORES NbIS, NbIR Y RpaB EN LA CIANOBACTERIA  
*Synechococcus* sp. PCC 7942**

**Ruiz, D.; Salinas, P.; Moronta, F.; Cantos, R.; Contreras, A.**

*Dpto. Fisiología, Genética y Microbiología. Universidad de Alicante.  
03690 San Vicente del Raspeig, Alicante*

Las cianobacterias poseen diversos mecanismos de adaptación a condiciones de estrés ambiental como la carencia de nitrógeno o la exposición a alta luz. Uno de esos procesos es el que se conoce con el nombre de “clorosis” o “bleaching”, durante el cual las cianobacterias degradan los ficobilisomas y adquieren un característico color amarillento. Se han identificado varias proteínas implicadas en la regulación de este proceso: NbIA (Non-bleaching-Activator) es esencial para llevar a cabo la activación de la clorosis y su transcripción está regulada por varias proteínas, entre las que se encuentran NbIR (Non-bleaching-Regulator), con homología con la familia de reguladores OmpR/PhoB y la histidina quinasa NbIS (Non-bleaching-Sensor). Se ha demostrado que NbIR es necesario para la activación de *nbIA* y que NbIS estaría inhibiendo *nbIA* en condiciones óptimas de crecimiento.

En este trabajo demostramos que, en contra de lo que parecía aceptado, NbIS y NbIR no forman parte del mismo sistema de dos componentes. En contraste con los reguladores de respuesta típicos de sistemas de dos componentes, NbIR no se activa por fosforilación y no parece recibir señales de una histidina quinasa. Discutiremos datos recientes con los reguladores NbIR, NbIS y RpaB de *Synechococcus* en relación a la importancia de residuos conservados en los sistemas de dos componentes.

Investigación financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia, proyectos BFU2005-02231, BFU2006-12424.

Bibliografía:

Espinosa, J, Fuentes I., Burillo S., Rodríguez-Mateos, F., and A. Contreras. “SipA, a novel type of protein from *Synechococcus* sp. PCC 7942, binds to the kinase domain of NbIS”. *FEMS Microbiology letters* (2006). 254: 41-47.

Salinas, P., Ruiz, D., Cantos, R., López-Redondo, M.L., Marina, A. and Contreras, A. “The regulatory factor SipA provides a link between NbIS and NbIR signal transduction pathways in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942”. *Molecular Microbiology* (2007). 66 (6): 1607-1619.

## GENES IMPLICADOS EN LA UTILIZACIÓN DE CIANATO POR *Pseudomonas pseudoalcaligenes* CECT5344

**Sáez L.P.<sup>1</sup>, Huertas M.J.<sup>1</sup>, Luque V.M.<sup>1</sup>, Martínez-Luque M.<sup>1</sup>, Blasco R.<sup>2</sup>, Moreno-Vivián C.<sup>1</sup>, Roldán M.D.<sup>1</sup>, Castillo F.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales, Edificio Severo Ochoa, 1ª Planta, Universidad de Córdoba,* <sup>2</sup>*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Genética, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura.*

El cianato es un intermediario del metabolismo del carbamil-fosfato y la urea, que resulta tóxico para los seres vivos porque su forma reactiva (isocianato) se une a los grupos amino y tiol de distintas proteínas y a los metales esenciales de diversas enzimas. La síntesis biológica del compuesto representa una proporción muy pequeña frente a la cantidad que se genera como residuo en determinadas actividades industriales, tales como la oxidación del cianuro con ozono, la síntesis de resinas fenólicas, etc. El origen natural del cianato explica la gran cantidad de estirpes capaces de degradarlo. Así, en bacterias gram negativas y en cianobacterias se han descrito diversas agrupaciones génicas implicadas en su metabolismo, aunque sólo el gen que codifica la cianasa (*cynS*) es común a todas ellas. La cianasa cataliza la transformación de cianato y bicarbonato en dióxido de carbono y amonio, permitiendo, por una parte, la eliminación de este compuesto tóxico del medio y, por otra, su empleo como fuente de nitrógeno. La proteína CynS de *P. pseudoalcaligenes* CECT5344 se ha expresado heterológicamente en *E. coli* y purificado. Su caracterización bioquímica revela que sus propiedades son muy distintas de las de otras cianasas descritas hasta la fecha: pH y temperatura óptimos de 8,5 y 65°C. Por otra parte, se ha clonado, secuenciado y caracterizado una región de 5,7 kb del DNA de esta bacteria que codifica una agrupación génica implicada en el metabolismo del cianato. Esta agrupación génica está formada por el gen estructural de la cianasa (*cynS*), de 0,4 kb, tres genes que codifican un transportador aniónico de tipo ABC (*cynA*, *cynB*, y *cynD*), de 1,4, 0,8 y 0,9 kb respectivamente, y un gen de 1,9 kb que codifica un activador transcripcional dependiente de  $\sigma^{54}$  (*cynF*).

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos del MEC BIO2005-07741-CO2-01, BIO2005-07741-CO2-02 y de la Junta de Andalucía (P-06-CVI-01728 y CVI0117). También se agradece su colaboración a la empresa Gemasur, S.L.

- 1) Espie, G. S., Jalali, F., Tong, T., Zacal, N. J., So, A. K.-C. (2007). Involvement of the *cynABDS* operon and the CO<sub>2</sub>-concentrating mechanism in the light-dependent transport and metabolism of cyanate by cyanobacteria. *J Bacteriol* 189: 1013-1024.
- 2) Guilloton, M., Karst, F. (1987). Cyanate specifically inhibits arginine biosynthesis in *Escherichia coli* K12: a case of by-product inhibition? *J Gen Microbiol* 133:655-665.
- 3) Kunz, D. A., Nagappan, O. (1989). Cyanase-mediated utilization of cyanate in *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11764. *App Environ Microbiol* 55: 256-258.
- 4) Luque-Almagro, V. M., Huertas, M. J., Martínez-Luque, M., Moreno-Vivián, C., Roldán, M. D., García-Gil, L. J., Castillo, F., Blasco, R. (2005). Bacterial degradation of cyanide and its metal complexes under alkaline conditions. *App Environ Microbiol* 71:940-947.

## LA SOBREEXPRESIÓN DE LA OXIDASA *cbb<sub>3</sub>* EN *Rhizobium etli* INCREMENTA LA TOLERANCIA DE *Phaseolus vulgaris* A LA SEQUÍA

Chouhra Talbi, Cristina Sánchez, Eulogio J. Bedmar y María J. Delgado.

*Departamento de Microbiología del Suelo y Sistemas Simbióticos, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Apartado Postal 419, 18080-Granada, España.*

La fijación simbiótica de nitrógeno y consecuentemente la producción de las leguminosas son altamente sensibles a estreses abióticos. El efecto negativo de los mismos sobre la fijación simbiótica de nitrógeno es consecuencia de una serie de mecanismos fisiológicos que afectan a la actividad nitrogenasa, entre los que cabe destacar el cierre de la barrera de difusión al oxígeno, provocando una disminución en la concentración de oxígeno disponible para la respiración bacteroidal (1). En este sentido, una posible estrategia a abordar para mejorar la tolerancia de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa a estreses abióticos consistiría en la inoculación con cepas de *Rhizobium* con mayor capacidad respiratoria. Recientemente, se ha demostrado que la inoculación de plantas de *Phaseolus vulgaris* con una cepa de *Rhizobium etli* que sobreexpresa la oxidasa terminal *cbb<sub>3</sub>* que opera en bacteroides confiere a las plantas mayor capacidad de fijar nitrógeno (2).

El objetivo principal de este trabajo ha sido establecer si la sobreexpresión de la oxidasa *cbb<sub>3</sub>* en los bacteroides confiere a las plantas de judía una mayor tolerancia a la sequía. Para ello, plantas de la variedad Flamingo de *Phaseolus vulgaris* se inocularon con la cepa CFNX713 que sobreexpresa la oxidasa *cbb<sub>3</sub>* (2) y se cultivaron en arena/vermiculita (1/1). El déficit hídrico se provocó a las cuatro semanas dejando de regar durante 4,7 y 10 días. Tras 7 días de déficit hídrico, se observó un descenso en el peso seco y contenido en nitrógeno de las plantas, siendo más significativo en las plantas inoculadas con la cepa parental que en las inoculadas con la cepa CFN713. Igualmente, la aplicación de 7 días de sequía provocó una mayor disminución de la actividad nitrogenasa y contenido en leghemoglobina de los nódulos producidos por la cepa parental en comparación con el efecto observado en los producidos por la cepa CFN713. Tras el aislamiento de los bacteroides se analizó la expresión de la oxidasa *cbb<sub>3</sub>* mediante detección de los citocromos *c* FixP y FixO que forman parte de dicha oxidasa. Los bacteroides aislados de nódulos de judía inoculada con la cepa CFN713 mostraron una mayor expresión de la oxidasa *cbb<sub>3</sub>* que los aislados de plantas inoculadas con la cepa parental, en todas las condiciones experimentales ensayadas. Proponemos que una mayor expresión en bacteroides de la oxidasa terminal *cbb<sub>3</sub>* incrementa la tolerancia de la fijación de nitrógeno de la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium etli* a la sequía.

1. Serraj, R (1995). *Plant Cell Environ* 18: 455-462.

2. Manuel Granados-Baeza, Yolanda Mora, María J. Delgado, David Romero and Lourdes Girard. (2007). *Molecular-Plant Microbe Interactions*. 20:1241-9.

Este trabajo se ha subvencionado con el Proyecto AGL2006-13848-CO2-02/AGR y la ayuda de la Junta de Andalucía al Grupo de Investigación CVI-275.

## SESIÓN DE CLAUSURA

## VIVENCIAS CON PEDRO APARICIO EN SEVILLA Y EL RESTO DEL MUNDO

**José M. Vega Piqueres**

*Depto. Bioquímica. Facultad de Química. Universidad de Sevilla.*

Conocí a Pedro J. Aparicio en Sevilla, en Octubre de 1968, cuando ingresé en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de Sevilla, para hacer la Tesis Doctoral. Eran tiempos duros, pero felices porque estábamos en un formidable grupo, dirigido por Losada y Paneque, y también integrado por Relimpio, Jacobo y Walter. Allí todos trabajábamos en todo y poco a poco se iban delimitando los campos de cada tesis, y nuestros principales objetivos eran la nitrato reductasa y la nitrito reductasa de espinacas y *Chlorella fusca*. Sus propiedades y regulación. Pedro y yo nos centramos en la NR y Jacobo en la NiR. Con Pedro me inicié en el trabajo de laboratorio, y de él aprendí muchas cosas, científicas y humanas.

Estudiábamos la NR y de nuestros experimentos recuerdo especialmente los que hicimos con el Mo99 y W185. Vimos que el wolframio desplazaba al Mo de la nitrato reductasa y la inactivaba, recuerdo un Sábado, ya tarde, que nos empeñamos en reconstituir la actividad *in vitro*, incubando una NR inactivada con W, con molibdato. Hubiera sido fenomenal, pero no nos salió. En otro tipo de experimentos, si nos salió la recuperación de la actividad NR, previamente inactivada por NADH y CN<sup>-</sup>, por oxidación con ferricianuro, lo que daba sentido a un posible significado fisiológico y permitió el desarrollo de una línea de trabajo muy fructífera. Por supuesto que lo celebramos.

Era frecuente, al terminar los experimentos, irnos por ahí a tomar una cerveza y a veces nos daban las tantas, pues teníamos un tema recurrente: el laboratorio. Cuando llegaba el fin de semana era cuando Pedro destapaba toda su capacidad de improvisación, terreno donde su imaginación llegaba hasta donde le llevara su coche, ya fuera el cuatro-latas, Morris, MG, u otro. Su habilidad como conductor me ha maravillado siempre por su rapidez y seguridad, lo que no impidió que un día que fuimos a Gelves, un pueblo de Sevilla que nos abastecía de espinacas frescas para nuestros experimentos, nos estrelláramos contra un árbol. Pedro era capaz de lo más inverosímil que puedan imaginar. Por ejemplo, un Sábado podíamos estar en el lab y después de comer decidir tomar un café, pero ¿a dónde vamos? No se, cogemos el coche y donde nos lleve, decía Pedro. Pues bien un día acabamos en Cádiz (110 Km), otro en Bailén (220 Km), otro día se le ocurrió decir cuando íbamos por Córdoba, ¡vámonos a Madrid! Así que os doy un consejo: Si un día Pedro os propone tomar café, haced la maleta por si acaso. Pedro, Jacobo y yo hicimos un viaje a Oeiras (Portugal) que ya forma parte de la épica de la Bioquímica sevillana. Lo contaré sin reservas ni tapujos.

En medio de anécdotas y viajes no nos ha pasado desapercibido que Pedro es una gran persona, amigo leal, asturiano honesto y sencillo. Enamorado de M<sup>a</sup> Pepa, le acompañé alguna vez cuando la buscaba por los campos de Castilla, como D. Quijote hiciera años antes con Dulcinea. Pero Pedro también tenía otra pasión, la investigación científica, donde ha desarrollado una gran labor que ha servido y sirve de ejemplo para otros que venimos detrás. Los que le hemos tratado y utilizado sus virtudes humanas y científicas para formarnos, somos sus amigos y ni una eternidad haría que nos olvidemos de este castellano recio que un día vino a Sevilla, y nos dejó su sabiduría y su impronta de hombre de bien.



## **METABOLISMO DEL NITRÓGENO Y FOTOSÍNTESIS, MI DESPEDIDA**

**Pedro J. Aparicio Alonso**

*Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC)*

*Madrid*

La cuarta dimensión no tiene fin y acaba retirándonos de nuestros afanes, pero el ánimo no debe desfallecer porque afortunadamente la vida continúa y se renueva. Hoy somos muchos más los que estamos empeñados en ensanchar nuestros conocimientos científicos del mundo que nos rodea.

Tengo que confesar que estoy satisfecho de mi modesta contribución al conocimiento del metabolismo del nitrógeno y al funcionamiento del aparato fotosintético. He asistido en primera línea a los descubrimientos clave que han puesto las bases de la Biología y Fisiología Vegetal actuales; me siento un privilegiado. Pero esta satisfacción y privilegio se deben en su mayor parte al apoyo y estímulo de mis maestros, mis jefes, mis compañeros y mis colaboradores, amén de los miembros de mi familia. A todos, mi más sincero agradecimiento y especialmente a mis amigos de los que estoy muy orgulloso por su gran talla profesional y humana. De no haber sido por ellos, hoy no estaría aquí expresándoles mi reconocimiento mas sincero.

Desde este nuevo estatus de jubilado, se me permitiría hacer algunas recomendaciones de cara al futuro, pero lo único que quiero es desearos mucha lucidez para encarar vuestros retos con fortuna. Hoy la actividad científica en España tiene un presente consolidado y el futuro será espléndido si sabemos identificar a tiempo a los falsos profetas.

Muchas gracias por todo...

## COMUNICACIONES DE LOS PARTICIPANTES

PARTICIPANTE	PÁGINAS
Acera Hernández, Felipe	73
Álvarez Muñoz, Laura	44
Aparicio Alonso, Pedro J.	88
Aparicio Tejo, Pedro M.	30, 31, 33, 34
Ariz Arnedo, Idoia	30, 31, 33, 34, 69
Artola Rezola, Ekhiñe	30, 31, 33, 34
Ávila Saez, Concepción	24, 41, 63, 64, 70
Azcón González de Aguilar, Concepción	39
Bautista Moreno, Rocío	76
Bautista Saiz, Vanesa	22, 38
Bedmar Gómez, Eulogio J.	45, 46, 48, 85
Berenguer Carlos, José	44, 50, 52
Betti, Marco	35, 55
Blasco Plá, Rafael	66, 68, 73, 74, 80, 84
Bonete Pérez, María José	17, 22, 38, 40, 47, 51
Bravo Barrales, Gloria	17, 38
Bueno Romero, Emilio	45
Camacho Carrasco, Mónica	17, 38
Camañes Querol, Gemma	32
Canales Carrasco, Javier	70
Cánovas Ramos, Francisco	24, 37, 41, 57, 62, 63, 64, 70, 76
Castells Rico, Miguel Ángel	14, 61
Castillo Rodríguez, Francisco	13, 66, 68, 74, 82, 84
Castro Rodríguez, Vanesa Viviana	62
Chahlafla Amara, Zahra	44, 50, 52
Contreras de Vera, Asunción	14, 59, 61, 79, 83
Credali, Alfredo	27
Cruchaga Moso, Saioa	30, 31, 33, 34
De la Haba Hermida, Purificación	18
De la Riva Pérez, Lucía	28
Delgado Igeño, María Jesús	45, 46, 48, 85
Díaz Gadea, Pedro	55, 71, 72
Díaz González, Susana	17
Díez Dapena, Jesús	25, 54, 58, 68
El Omari, Redouane	63

Esclapez Espliego, Julia M.	22, 40, 51
Espinosa Manzano, Javier	14, 61
Estavillo Aurre, Jose María	75
Fernández Reyes, Emilio	11, 12, 19, 20, 21
Flores Fernández-Villamil, M <sup>a</sup> Pilar	77
Flores Monterroso, Aranzazu	64, 65
Frías Sánchez, José Enrique	15
Fuertes de Mendizábal, Teresa	75
Galmazzi, Carla Verónica	42, 56
Gallardo Alba, Fernando	57
García Calderón, Margarita	72
García Fernández, J. Manuel	25, 54, 58, 65
Gómez Baena, Guadalupe	25, 54, 58, 65
Gómez Cruz, Rodolfo	13
Guardado Villau, Pilar	35
Guijo Sánchez, M <sup>a</sup> Isabel	73
Higuera Sobrino, José Javier	11, 19
Huertas Romera, M <sup>a</sup> José	66, 68, 74, 84
Igeño González, M <sup>a</sup> Isabel	80
Lambert Rodríguez, Rocío	36
Lantero García, Aquilino	30, 69
López Gómez, Miguel	78
López Lozano, Antonio	25, 54, 58, 65, 77
López Redondo, Marisa	79
Lucas-Reina, Eva	37
Luque Almagro, Víctor M.	66, 68, 74, 84
Llácer Guerri, Jose Luis	60
Llamas Azúa, Ángel	11, 20, 21
Llorca Álaraz, Francisco I.	38
Lluch Plá, Carmen	78
Maldonado Ruiz, Jose M <sup>a</sup>	26
Márquez Cabeza, Antonio J.	27, 35, 55, 71, 72
Mariscal Romero, Vicente	11, 49
Martínez Espinosa, Rosa María	22, 40, 47, 51
Martínez Luque-Romero, Manuel	66, 68, 74, 84
Merchán Sorio, Faustino	80
Molina Rueda, Juan Jesús	57

Morán Juez, José Fernando	30, 31, 33, 34, 69
Moreno Vivián, Conrado	13, 66, 68, 74, 82, 84
Moronta Barrios, Félix	83
Pajuelo Domínguez, Eloisa	81
Pedro Roig, Laia	17, 38
Pérez Pomares, Francisco	40
Pérez Tienda, Jacob Rafael	39
Pineda Priego, Manuel	29, 36
Pire Galiana, Carmen L.	17, 40
Quiles Luque, Francisco A.	29
Rangel Zúñiga, Oriol	25, 54, 65
Rexach Benavides, Jesús	26
Richardson, David	10, 46, 47
Roldán Ruiz, M <sup>a</sup> Dolores	13, 66, 68, 74, 82, 84
Rubio Zamora, Vicente	60
Rueda López, Marina	24, 41, 63, 64
Saelices Gómez, Lorena	42, 56
Sáez Melero, Lara Paloma	68, 84
Sánchez Gómez, Cristina	46, 85
Sanz Luque, Emmanuel	11, 12, 21
Siverio Expósito, Jose M.	16
Suárez Marín, M <sup>a</sup> Fernanda	37, 70
Tejada Jiménez, Manuel	11, 20, 21
Urarte Rodríguez, Estibaliz	69
Vega Piqueres, Jose María	87
Zafrilla Requena, Basilio J.	22, 51

## DIRECCIÓN ELECTRÓNICA DE LOS PARTICIPANTES

PARTICIPANTES	CENTRO	e-mail
Acera Hernández, Felipe	Universidad de Extremadura	felacer@unex.es
Álvarez Muñoz, Laura	Universidad Autónoma de Madrid	lalvarez@cbm.uam.es
Aparicio Alonso, Pedro J.	CSIC – Madrid	pjaparicio@cib.csic.es
Aparicio Tejo, Pedro M.	Universidad Pública de Navarra	pmapariciotejo@unavarra.es
Ariz Arnedo, Idoia	Universidad Pública de Navarra	Idoia.ariz@unavarra.es
Artola Rezola, Ekhiñe	Universidad Pública de Navarra	ekhine.artola@unavarra.es
Ávila Saez, Concepción	Universidad de Málaga	cavila@uma.es
Azcón González de Aguilar, Concepción	CSIC – Granada	cazcon@eez.csic.es
Bautista Moreno, Rocío	Universidad de Málaga	rociobm@uma.es
Bautista Saiz, Vanesa	Universidad de Alicante	vanesa.bautista@ua.es
Bedmar Gómez, Eulogio J.	CSIC – Granada	ejbedmar@eez.csic.es
Berenguer Carlos, José	Universidad Autónoma de Madrid	jberenguer@cbm.uam.es
Betti, Marco	Universidad de Sevilla	mbetti@us.es
Blasco Plá, Rafael	Universidad de Extremadura	rblasco@unex.es
Bonete Pérez, María José	Universidad de Alicante	mjbonete@ua.es
Bravo Barrales, Gloria	Universidad de Alicante	bravo.barrales@ua.es
Bricio Garberí, Carlos	Universidad Autónoma de Madrid	cbricio@cbm.uam.es
Bueno Romero, Emilio	CSIC – Granada	ebueno@eez.csic.es
Camacho Carrasco, Mónica	Universidad de Alicante	camacho@ua.es
Camañes Querol, Gemma	Universidad Jaume I	camanes@camn.uji.es
Canales Carrasco, Javier	Universidad de Málaga	fjcanales@uma.es

Cánovas Ramos, Francisco	Universidad de Málaga	canovas@uma.es
Castells Rico, Miguel Ángel	Universidad de Alicante	ma.castells@ua.es
Castillo Rodríguez, Francisco	Universidad de Córdoba	bb1carof@uco.es
Castro Rodríguez, Vanesa Viviana	Universidad de Málaga	vavicaro@gmail.com
Chahlaf Amara, Zahra	Universidad Autónoma de Madrid	zchahlaf@cbm.uam.es
Contreras de Vera, Asunción	Universidad de Alicante	contrera@ua.es
Credali, Alfredo	Universidad de Sevilla	alfredocreda@us.es
Cruchaga Moso, Saioa	Universidad Pública de Navarra	saioa.cruchaga@unavarra.es
De la Haba Hermida, Purificación	Universidad de Córdoba	bv1hahep@uco.es
De la Riva Pérez, Lucía	Universidad de Barcelona	luciadriva@yahoo.es
Delgado Igeño, María Jesús	CSIC – Granada	mdelgado@eez.csic.es
Díaz Gadea, Pedro	Universidad de Sevilla	pediaz@fagro.edu.uy
Díaz González, Susana	Universidad de Alicante	susana.diaz@ua.es
Díez Dapena, Jesús	Universidad de Córdoba	bb1didaj@uco.es
El Omari, Redouane	Universidad de Málaga	elomari_redouane@yahoo.fr
Esclapez Espliego, Julia M.	Universidad de Alicante	julia.esclapez@ua.es
Espinosa Manzano, Javier	Universidad de Alicante	javier.espinosa@ua.es
Estavillo Aurre, Jose María	Universidad del País Vasco	jm.estavillo@ehu.es
Fernández Reyes, Emilio	Universidad de Córdoba	bb1feree@uco.es
Flores Fernández-Villamil, M <sup>a</sup> Pilar	IMIDA	mpilar.flores@carm.es
Flores Monterroso, Aranzazu	Universidad de Málaga	arantxaf@uma.es
Frías Sánchez, José Enrique	CSIC – Sevilla	frias@ibvf.csic.es
Fuertes de Mendizábal, Teresa	Universidad del País Vasco	teresa.fuertes@ehu.es
Galmozzi, Carla Verónica	CSIC – Sevilla	carla@ibvf.csic.es

Gallardo Alba, Fernando	Universidad de Málaga	fgallardo@uma.es
García Calderón, Margarita	Universidad de Sevilla	marbioq@us.es
García Fernández, J. Manuel	Universidad de Córdoba	bb1gafej@uco.es
Gates, Andrew J.	University of East Anglia	
Gómez Baena, Guadalupe	Universidad de Córdoba	v52gobag@uco.es
Gómez Cruz, Rodolfo	Universidad de Córdoba	bb2rorum@uco.es
González Moro, Jose María	Universidad del País Vasco	
Guardado Villau, Pilar	Universidad de Sevilla	guardado@us.es
Guijo Sánchez, M <sup>a</sup> Isabel	Universidad de Extremadura	mguijo@unex.es
Higuera Sobrino, José Javier	Universidad de Córdoba	b92hisoj@uco.es
Huertas Romera, M <sup>a</sup> José	Universidad de Córdoba	bb2hurom@uco.es
Igeño González, M <sup>a</sup> Isabel	Universidad de Extremadura	migeno@unex.es
Lambert Rodríguez, Rocío	Universidad de Córdoba	b02laror@uco.es
Lantero García, Aquilino	Universidad Pública de Navarra	aquilino.lantero@unavarra.es
López Gómez, Miguel	Universidad de Granada	mlgomez@ugr.es
López Lozano, Antonio	Universidad de Córdoba	b72lolof@uco.es
López Redondo, Marisa	CSIC – Valencia	mlopez@ibv.csic.es
Lucas-Reina, Eva	Universidad de Málaga	evalucasr@gmail.com
Luque Almagro, Víctor M.	Universidad de Córdoba	B42lualv@uco.es
Llácer Guerri, Jose Luis	CSIC - Valencia	jllacer@ibv.csic.es
Llama Fontal, M <sup>a</sup> Jesús	Universidad del País Vasco	gbpllfom@lg.ehu.es
Llamas Azúa, Ángel	Universidad de Córdoba	bb2llaza@uco.es
Llorca Álcara, Francisco I.	Universidad de Alicante	florca@ua.es
Lluch Plá, Carmen	Universidad de Granada	clluch@ugr.es

Maldonado Ruiz, Jose M <sup>a</sup>	Universidad de Sevilla	maldonado@us.es
Márquez Cabeza, Antonio J.	Universidad de Sevilla	cabeza@us.es
Mariscal Romero, Vicente	CSIC – Sevilla	vicente.mariscal@ibvf.csic.es
Martínez Espinosa, Rosa María	Universidad de Alicante	rosa.martinez@ua.es
Martínez Luque-Romero, Manuel	Universidad de Córdoba	bb2rorum@uco.es
Merchán Sorio, Faustino	Universidad de Extremadura	fmerchan@unex.es
Molina Rueda, Juan Jesús	Universidad de Málaga	juanjmolina@uma.es
Morán Juez, José Fernando	Universidad Pública de Navarra	jose.moran@unavarra.es
Moreno Vivián, Conrado	Universidad de Córdoba	bb1movic@uco.es
Moronta Barrios, Félix	Universidad de Alicante	Felix.moronta@ua.es
Pajuelo Domínguez, Eloisa	Universidad de Sevilla	epajuelo@us.es
Pedro Roig, Laia	Universidad de Alicante	laia.pedro@ua.es
Pérez Pomares, Francisco	Universidad de Alicante	paco.perez@ua.es
Pérez Tienda, Jacob Rafael	CSIC – Granada	jacob.perez@eez.csic.es
Pineda Priego, Manuel	Universidad de Córdoba	bb1piprm@uco.es
Pire Galiana, Carmen L.	Universidad de Alicante	carmen.pire@ua.es
Quiles Luque, Francisco A.	Universidad de Córdoba	tipejos@terra.es
Quinones Gómez, M. Ángel	CSIC	
Rangel Zúñiga, Oriol	Universidad de Córdoba	bb2razuo@uco.es
Rexach Benavides, Jesús	Universidad Pablo de Olaviade	jrexben@upo.es
Richardson, David	University of East Anglia	d.richardson@uea.ac.uk
Roldán Ruiz, M <sup>a</sup> Dolores	Universidad de Córdoba	bb2rorum@uco.es
Rubio Zamora, Vicente	CSIC – Valencia	rubio@ibv.csic.es
Rueda López, Marina	Universidad de Málaga	mrueda@uma.es



Saelices Gómez, Lorena	Universidad de Sevilla	lorenasaelices@hotmail.com
Sáez Melero, Lara Paloma	Universidad de Córdoba	bb2samel@uco.es
Sánchez Gómez, Cristina	CSIC – Granada	crisrina.sanchez@eez.csic.es
Sanz Luque, Emmanuel	Universidad de Córdoba	q92salue@uco.es
Serra Ferrer, Juan Luis	Universidad del País Vasco	juanl.serra@ehu.es
Siverio Expósito, Jose M.	Universidad de la Laguna	jsiverio@ull.es
Suárez Marín, M <sup>a</sup> Fernanda	Universidad de Málaga	
Tejada Jiménez, Manuel	Universidad de Córdoba	q62tejim@uco.es
Urarte Rodríguez, Estibaliz	Universidad Pública de Navarra	estibaliz.urarte@unavarra.es
Vega Piqueres, Jose María	Universidad de Sevilla	jmvega@us.es
Zafrilla Requena, Basilio J.	Universidad de Alicante	basilio.zafrilla@ua.es