

ASOCIACIÓN ESPAÑOLA DE LEGUMINOSAS

**IV JORNADAS DE LA AEL
V SEMINARIO DE JUDÍA**

Coordinador: Antonio M. De Ron

PONTEVEDRA 2012



Deputación
Pontevedra



Asociación
Española
Leguminosas

ISBN: 978-84-695-3627-8

Edita: Asociación Española de Leguminosas (AEL)

Maquetación: Imagen Institucional, Diputación de Pontevedra

Pontevedra, 2012

UTILIZACIÓN DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium*- LEGUMINOSA EN LA RECUPERACIÓN DE SUELOS MARGINALES: APROXIMACIONES BIOTECNOLÓGICAS

*Coba de la Peña T; Ruiz-Díez B; García de la Torre VS; Nonnoi F; Lucas MM;
Fernández-Pascual M; Quiñones MA; Rincón A; Pueyo JJ*

Instituto de Ciencias Agrarias. CSIC. Madrid, España

Abstract: Increasing soil salinity represents a major constraint for agriculture in arid and semi-arid areas, where mineral nitrogen deficiency is also a frequent characteristic of soils. Biological nitrogen fixation by legumes constitutes a sustainable and environmental-friendly alternative to chemical fertilization and therefore, legumes have great potential in the reclamation of saline soils for sustainable agriculture. This need is becoming more urgent due to the ever-rising requirement for food, and the increasing extension of salinized and degraded lands, both as a consequence of global change and irrigation practices. Additionally, pollution due to heavy metals is an ever-increasing problem worldwide, and *Rhizobium*-legume symbioses represent an interesting potential tool in soil bioremediation. Besides their nitrogen-fixing capacity, they have the advantage of integrating microorganisms, which may influence metal bioavailability, and legume plants that may act as phytoextractors or phytostabilisers. Abiotic stresses, though, adversely affect legume yield, as symbiotic nitrogen fixation is extremely sensitive to such stresses. Thus, it becomes of great interest to obtain bacterial inocula and legume varieties with enhanced tolerance to abiotic stresses which can be achieved by traditional trait selection or by biotechnological procedures. Recent advances in the field indicate that the role of legumes in sustainable agriculture, and particularly, their use in the reclamation of marginal lands, certainly has an extremely promising future.

Keywords: legume, Rhizobium, soil, nitrogen fixation, salinity, heavy metals

Resumen: El aumento de la salinidad de los suelos representa un grave problema para la agricultura en regiones áridas y semi-áridas, donde la deficiencia en nitrógeno es también una característica frecuente. La fijación biológica de nitrógeno constituye una alternativa sostenible y medioambiental a la fertilización nitrogenada y por tanto las leguminosas tienen gran potencial en la recuperación de suelos salinos para una agricultura sostenible. Esta necesidad es cada vez más urgente debido a la creciente demanda de alimentos y al aumento de la extensión de suelos salinizados como consecuencia del cambio global y las prácticas de riego. Por otra parte, la contaminación debida a metales pesados es un problema creciente en todo el mundo y la simbiosis Rhizobium-leguminosa representa una herramienta de potencial interés en la biorremediación de suelos. Además de su capacidad de fijar nitrógeno, tienen la ventaja de integrar microorganismos, que pueden influir en la biodisponibilidad de los metales, y plantas que pueden actuar como fitoextractoras o fitoestabilizadoras. Sin embargo, los estreses abióticos afectan negativamente al rendimiento de las leguminosas, ya que la fijación de nitrógeno es extremadamente sensible a dichos estreses. Por tanto, es primordial obtener inóculos bacterianos y variedades de leguminosas con tolerancia a los estreses abióticos, lo cual puede conseguirse por métodos de selección o mediante aproximaciones biotecnológicas. Los recientes avances en este campo indican que el papel de las leguminosas en una agricultura sostenible y particularmente su uso en la recuperación de suelos marginales tiene ciertamente un futuro prometedor.

Palabras clave: leguminosa, rizobio, suelo, fijación de nitrógeno, salinidad, metales pesados

Es innegable que los estreses abióticos, tales como sequía, salinidad o contaminación por metales pesados, constituyen factores críticos que limitan la producción agrícola. La productividad de las leguminosas se ve afectada por los estreses abióticos ya que la eficiencia de la simbiosis Rhizobium-leguminosa se ve drásticamente disminuida. Los suelos de zonas áridas y semiáridas, afectados por sequía y salinidad, son frecuentemente pobres en nitrógeno por lo que leguminosas que sean tolerantes a dichos estreses poseen un gran potencial en la utilización de suelos marginales. Las estrategias para obtener tolerancia a estreses abióticos en leguminosas implican un sistema de alta complejidad en el que no sólo hay que considerar la planta, sino también la bacteria, el proceso simbiótico y la capacidad de fijación de nitrógeno. Sin duda, la obtención de leguminosas tolerantes debe complementarse con la obtención de inoculantes rizobianos que sean más efectivos bajo estreses abióticos. Así, la producción de los cultivos de leguminosas en condiciones adversas se podrá incrementar mediante la utilización de combinaciones adecuadas de simbioses (planta y microorganismo).

La contaminación por metales pesados constituye un grave problema medioambiental que en el caso de los suelos, afecta a la fertilidad y el uso posterior de los mismos. La remediación de estos ambientes contaminados mediante la utilización de métodos químicos involucra procesos de elevado coste y agresivos con el medio ambiente. La biorremediación o utilización de métodos biológicos para remediar un ambiente contaminado se plantea como una alternativa económica y respetuosa con el ambiente. La interacción simbiótica Rhizobium-leguminosa ha sido propuesta como una interesante herramienta de biorremediación. Una leguminosa tolerante puede actuar como planta fitoextractora si acumula el metal en la parte aérea o como fitoestabilizadora si lo hace en la raíz. Los rizobios pueden aumentar la biodisponibilidad de los iones de los metales pesados y favorecer su absorción por la planta. Algunas leguminosas han sido probadas en la

fitoextracción de metales constatando que la inoculación con rizobios aislados del propio suelo contaminado tiene un efecto positivo en su establecimiento y rendimiento (Dary et al., 2010).

Los mecanismos que desencadenan los diferentes estreses abióticos, y que son los que realmente provocan efectos nocivos para los nódulos, tienen características comunes que implican en general la generación de especies reactivas de oxígeno con la consecuente alteración del balance oxidativo (Becana et al., 2000). Las respuestas de la planta a diferentes estreses también presentan comportamientos comunes como alteraciones en la expresión de determinados genes, variaciones en actividades enzimáticas del metabolismo oxidativo o acumulación de osmolitos (Coba de la Peña et al. 2012). Además de la selección de variedades de leguminosas e inoculantes rizobianos, el conocimiento de los mecanismos implicados en la tolerancia se está utilizando en la obtención biotecnológica de leguminosas e inoculantes de indudable potencial. Hemos seleccionado inoculantes rizobianos de cacahuete (*Arachis hypogaea*) que presentan alta tolerancia al estrés salino y son eficientes en la fijación de nitrógeno (El-Akhal et al., 2008) y que en condiciones de salinidad resultan comparables a la fertilización nitrogenada (El-Akhal et al., 2012) para algunas variedades de cacahuete. Hemos constatado que el altramuza blanco (*Lupinus albus*) es altamente tolerante a diferentes estreses abióticos, incluyendo metales pesados y tiene un gran potencial para su utilización en fitorremediación de suelos contaminados (Zornoza et al., 2002; Fernández-Pascual et al., 2007). Hemos identificado cepas de rizobios de suelos contaminados con alta tolerancia al Hg (Ruiz-Díez et al., 2012) y hemos observado que la inoculación de plantas de altramuza con una de estas cepas tolerantes confiere a las plantas ventajas que permiten su crecimiento en presencia de altas concentraciones de Hg en que las plantas no crecen si son inoculadas con una cepa sensible. También hemos analizado germoplasma de *Medicago truncatula* e identificado cultivares altamente tolerantes a Cd y/o Hg, con crecimiento superior (hasta un 140%) en presencia de dichos metales en

relación a los controles en ausencia de metales (García de la Torre et al., 2010). Su inoculación con cepas tolerantes aisladas aumentará previsiblemente su tolerancia, generando un sistema de biorremediación con alto potencial, debido al rápido crecimiento y fácil cosecha de esta leguminosa forrajera.

Por otra parte, hemos estudiado diferentes aspectos de tolerancia de las leguminosas a estreses abióticos mediante aproximaciones biotecnológicas como la producción de plantas y rizobios transgénicos que expresan algunos genes que dan lugar a la acumulación de osmolitos (prolina, glicina-betaína, manitol) o genes de proteínas que mejoran el balance oxidativo (flavodoxina). Hemos observado una mayor tolerancia en cuanto a fijación de nitrógeno en condiciones de estrés salino y estrés por metales pesados en plantas transgénicas o en plantas noduladas por bacterias transgénicas, y hemos propuesto algunos mecanismos comunes a la tolerancia a ambos estreses (Verdoy et al., 2006; Redondo et al., 2009; Shvaleva et al., 2010; Coba de la Peña et al., 2010). De hecho, en nuestro laboratorio se obtuvieron las primeras leguminosas transgénicas con tolerancia a estreses abióticos a nivel de la fijación biológica de nitrógeno (Verdoy et al., 2006).

En conclusión, nuestros resultados y los de otros grupos son evidencia del esfuerzo que se está llevando a cabo para seleccionar variedades de leguminosas y microorganismos capaces de fijar nitrógeno y dar lugar a rendimientos aceptables en suelos degradados o contaminados. La comprensión de los mecanismos fisiológicos y moleculares implicados en la tolerancia a los estreses ambientales está generando aproximaciones biotecnológicas para la obtención de leguminosas y rizobios con elevada tolerancia a dichos estreses, prestando especial atención a la fijación biológica de nitrógeno. En un contexto de cambio global y una creciente demanda de alimentos, la importancia de las leguminosas en una agricultura sostenible, principalmente en suelos marginales, es indudable. Por diferentes razones, la

agricultura sostenible es cada vez más una necesidad universal. Mientras los países menos desarrollados precisan incrementar los rendimientos y explotar suelos afectados por salinidad o sequía, en los países más desarrollados aumenta la demanda de alimentos orgánicos, la concienciación medioambiental y la necesidad de recuperar áreas degradadas. En todo ello, la obtención de leguminosas con elevada tolerancia a los estreses ambientales tendrá con toda seguridad un papel decisivo.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación recibida del Ministerio de Ciencia e Innovación, Ministerio de Educación, Comunidad de Madrid, Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, Fundación Areces, Agencia Española para la Cooperación Internacional y el Desarrollo y Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Referencias

- Becana M, Dalton DA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Matamoros MA, Rubio MC. 2000. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiol. Plant.* 109: 372-381.
- Coba de la Peña T, Redondo FJ, Manrique E, Lucas MM, Pueyo JJ. 2010. Nitrogen fixation persists under conditions of salt stress in transgenic *Medicago truncatula* plants expressing a cyanobacterial flavodoxin. *Plant Biotechnol. J.* 8: 954-965.
- Coba de la Peña T, Pueyo JJ. 2012. Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculants selection to transgenic approaches. *Agron. Sustain. Dev.* 32: 65-91.
- Dary M, Chamber-Pérez MA, Palomares AJ, Pajuelo E. 2010. "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. *J. Hazard. Mater.* 177: 323-330.
- El-Akhal MR, Rincón A, Arenal F, Lucas MM, El Mourabit N, Barrijal S, Pueyo

- JJ. 2008. Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial isolates obtained from nodules of *Arachis hypogaea* in northwestern Morocco. *Soil Biol. Biochem.* 40: 2911-2914.
- El-Akhal MR, Rincón A, Coba de la Peña T, Lucas MM, Barrijal S, Pueyo JJ. 2012. Effects of salinity and rhizobial inoculation on peanut varieties cultivated in Morocco. *Plant Biol.*
- Fernández-Pascual M, Pueyo JJ, de Felipe MR, Golvano MP, Lucas MM. 2007. Singular features of the *Bradyrhizobium-Lupinus* symbiosis. *Dyn. Soil, Dyn. Plant* 1: 1-16.
- García de la Torre VS, Coba de la Peña T, Lucas MM, Pueyo JJ. 2010. *Medicago truncatula* germplasm screening for cadmium and mercury tolerance. En: M. Becana (ed.) *Biological Nitrogen Fixation and Plant-Associated Microorganisms*. 243-244.
- Redondo FJ, Coba de la Peña T, Morcillo CN, Lucas MM, Pueyo JJ. 2009. Overexpression of flavodoxin in bacteroids induces changes in antioxidant metabolism leading to delayed senescence and starch accumulation in alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 149: 1166-1178.
- Ruiz-Díez B, Quiñones MA, Fajardo S, López MA, Higuera P, Fernández-Pascual M. 2012. Mercury-resistant rhizobial bacteria isolated from nodules of leguminous plants growing in high Hg-contaminated soils *Appl. Microbiol. Biotechnol* (en prensa).
- Shvaleva A, Coba de la Peña T, Rincón A, Morcillo CN, García de la Torre VS, Lucas MM, Pueyo JJ. 2010. Flavodoxin overexpression reduces cadmium-induced damage in alfalfa root nodules. *Plant Soil* 326: 109-121.
- Verdoy D, Coba de la Peña T, Redondo FJ, Lucas MM, Pueyo JJ. 2006. Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to salt stress. *Plant Cell Environ.* 29: 1913-1923.
- Zornoza P, Vázquez S, Esteban S, Fernández-Pascual M, Carpena R. 2002. Cd-stress in nodulated lupin: strategies to avoid toxicity. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 1003-1009.