



2016

**AÑO INTERNACIONAL
DE LAS LEGUMBRES**

Restaurando el suelo : legumbres y medio ambiente

Dra. Carmen Lluch Plá

Departamento de Fisiología Vegetal, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada

LEGUMINOSAS

A close-up photograph of a large variety of legumes, including beans, lentils, and chickpeas, arranged in a colorful, multi-colored pattern. The colors range from dark purple and black to bright red, orange, yellow, green, and white. The legumes are piled together, creating a textured and visually appealing display.

- 2016 Año Internacional de las legumbres en 68ª periodo de sesiones de la ONU, encargando a la FAO su celebración: objetivo y conexiones
- Hay 3 retos actuales que se enfrenta la humanidad: la falta de alimentos, la degradación ambiental y energía.
- Todos ellos vinculadas con dos actividades enzimáticas la rubisco y la nitrogenasa que proporcionan energía, CHs y proteínas .

A) Restauración del suelo

Estabilidad de ecosistemas naturales y agrícolas.

Calidad del suelo, Factores ambientales y
Agricultura química vs sostenibilidad.

Rizosfera : Interacción planta microorganismos

Procesos biológicos

B) Interés de las leguminosas.

Agronómico y Genético

C) Fijación simbiótica de nitrógeno:

Proceso de Haber Bosch

Proceso de nodulación: Nitrogenasa

**Posibilidad de la transferencia de la fijación
de N₂ a otros cultivos (cereales)**

Estabilidad de los ecosistemas naturales y agrícolas en la recuperación del suelo

✓ De la calidad del suelo:

a) Estructura física

b) Procesos químicos

c) Procesos biológicos: Interacción suelo planta

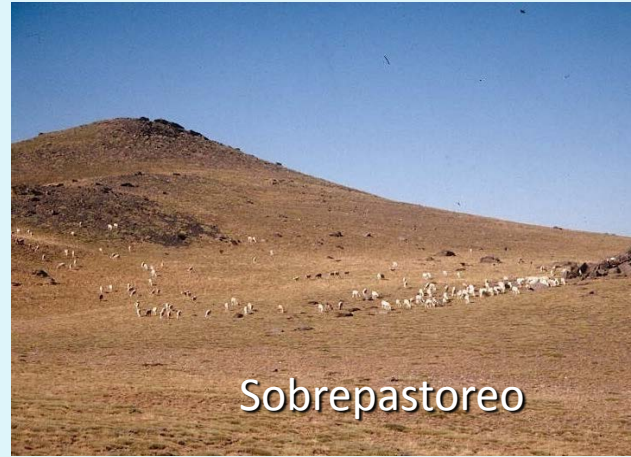
✓ De los factores ambientales, climatológicos, geomorfológicos y humanos

✓ De la agricultura química

1.- La estabilidad de los ecosistemas depende de la calidad del suelo

- Estructura Física : Formación de agregados, poros y la textura
- Procesos Químicos: Descomposición de materia orgánica dinámica de los elementos minerales, ciclado de nutrientes,
- Procesos Biológicos: Interacción suelo-planta interviene la biota (microfauna/flora)

2.- Factores ambientales: climáticos, geomorfológicos y/o humanos



Degradación de la cubierta vegetal y erosión del suelo



3.- Practicas agronómicas con abuso de agroquímicos

Abonos
Fungicidas
Herbicidas
Pesticidas
Lodos
Purinas
Gallinazas
Alpechines



La llamada “agricultura química”



Exceso en fertilización nitrogenada



-Lixiviación (eutrofización de las aguas)
-Metahemoglobinemia
-Alto costo energético

-Limitado a países en desarrollo
-Producen NO y N₂O (cambio climático)

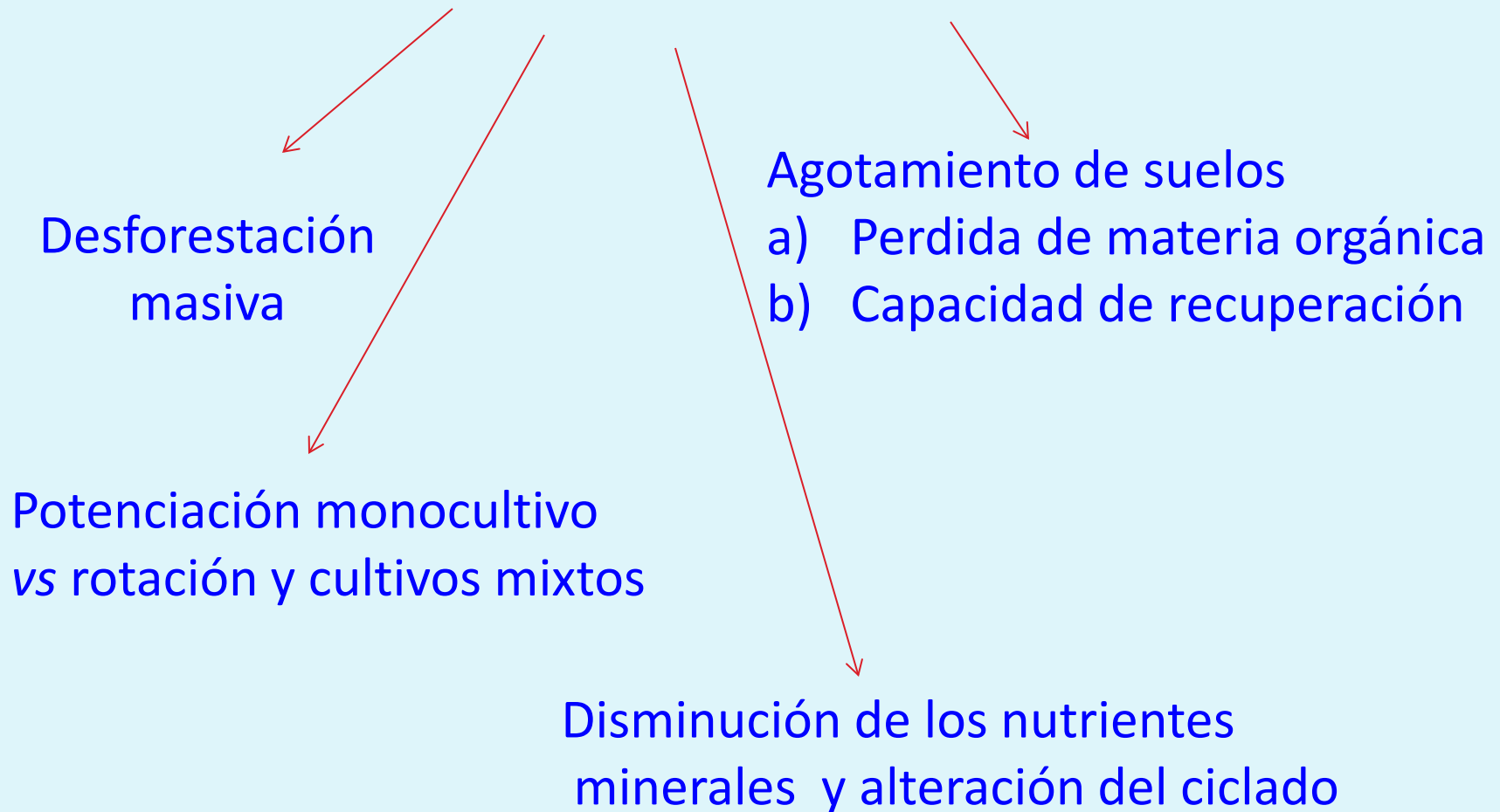


a) El avance espectacular de la **AGRICULTURA QUIMICA** mediados del siglo 20 se relaciona con la utilización masiva de **fertilizantes químicos y pesticidas**.

b) Se acuña el termino de **REVOLUCION VERDE** en 1968 por el Director de la Agencia para el Desarrollo Internacional. En relación con gran incremento de trigo y arroz en países en vías de desarrollo, (con ayuda de fertilizante químico), que controló la hambruna prevista.

c) Un referente son las variedades de alto rendimiento de trigos Dr. Borlaug en el CIMMT. Este proceso, **que no fue contestado por ecologistas**, demostró a los agricultores los beneficios que puede obtener la agricultura, basados en lo que la ciencia puede producir.

La gran presión sobre el sistema agrario



Estos efectos condicionan que la revolución verde fuera demasiado optimista

1987 Comisión Mundial del Desarrollo y Medio Ambiente define Agricultura sostenible.

Explotar los recursos renovables

Disminuir los residuos en alimentos y aguas.

Disminuir la utilización de materiales producidos con consumo de energía.

Disminuir la utilización de sustancias químicas: fertilizantes nitrogenados.

Mantener y mejorar la calidad del medioambiente

Favorecer la evolución de las especies

Evitar la degradación de los recursos agrícolas.

Preservar las comunidades vegetales.

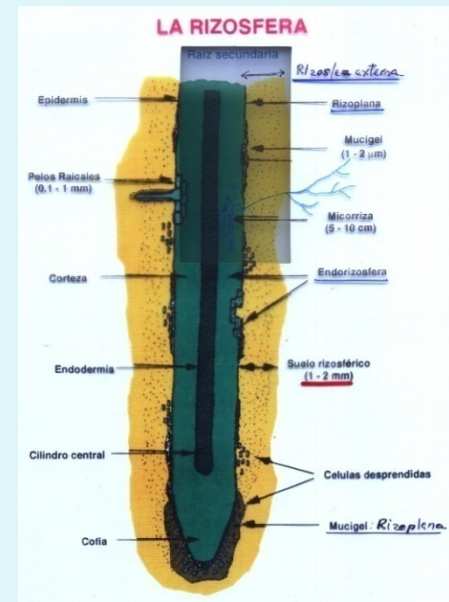
Reducir la erosión del suelo.

Optimizar el ciclado de materia orgánica y nutrientes.

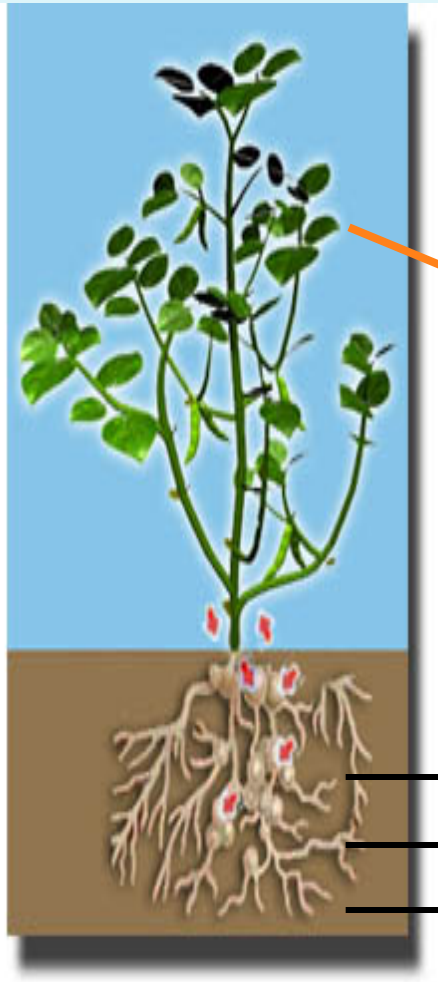
Consiste en satisfacer las necesidades del presente sin comprometer las necesidades de las generaciones futuras.

Prácticas agrícolas: efecto rizosférico

(Estabilidad del suelo en el ecosistemas)



Rizosfera



10-30%
FS

Exudados

Magnitud

Tipo de suelo

Especie vegetal

Edad del cultivo

Medio ambiente

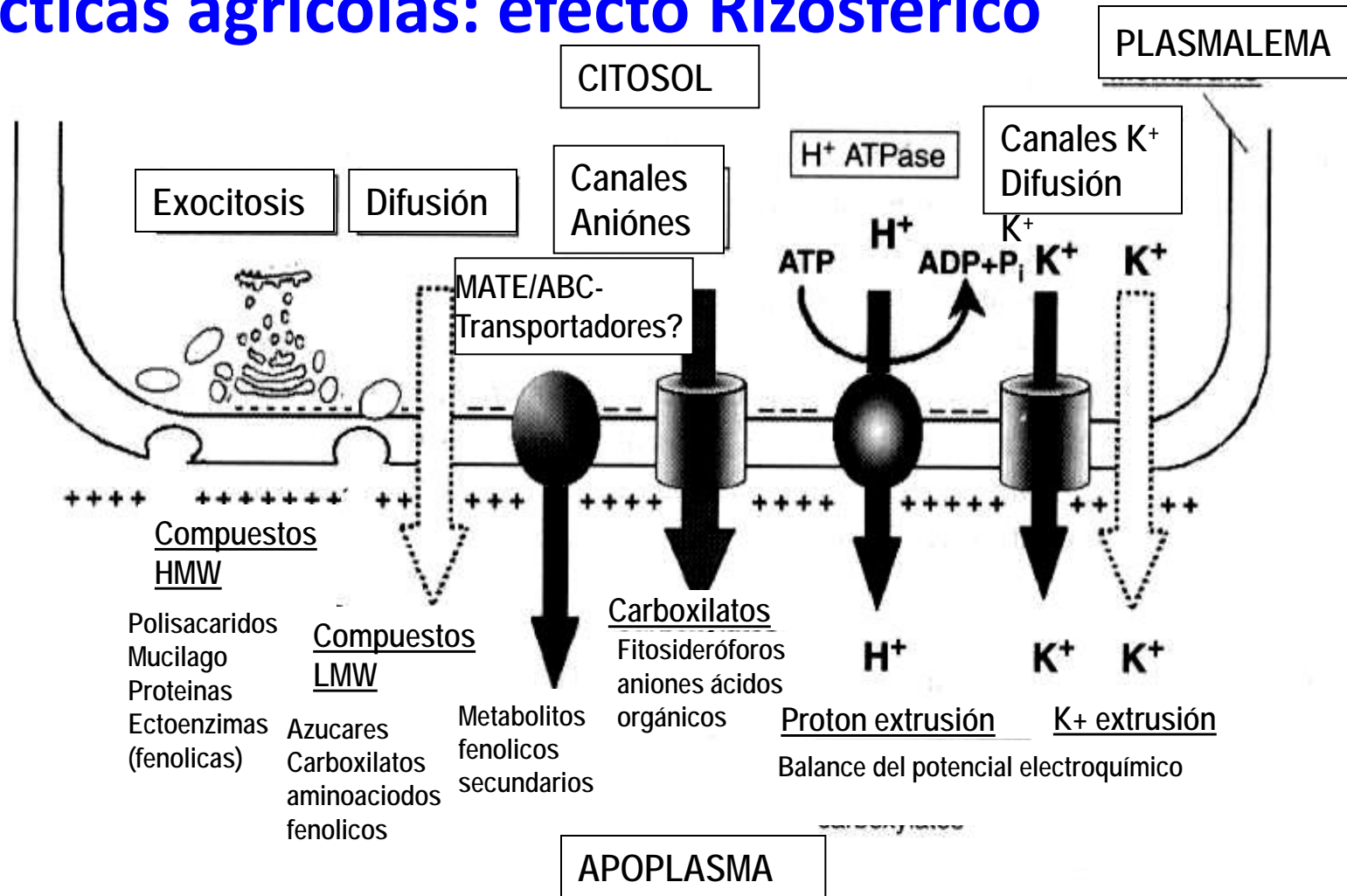
Tipos de moléculas

↑ PM

↓ PM

Funciones establecidas

Prácticas agrícolas: efecto Rizosférico



Mecanismos involucrados en la liberación de exudados radicales

Funciones de los exudados

- Adquisición de nutrientes
- Absorción de agua (liberan sustancias mucilaginosas)
- Protección frente a patógenos (liberan fitoalexinas)
- Protección frente a elementos tóxicos
- Establecer relaciones simbióticas
- Producción de agentes aleloquímicos
- Selección de microorganismos específicos
- Quorum sensing: Perciben la densidad de población
- Inducción de la ISR (Resistencia Sistémica Inducida)

Percepción del “quorum sensing”

Respuesta fisiológica de la planta: activación de genes específicos que perciben la densidad población bacteriana y otros microorganismos

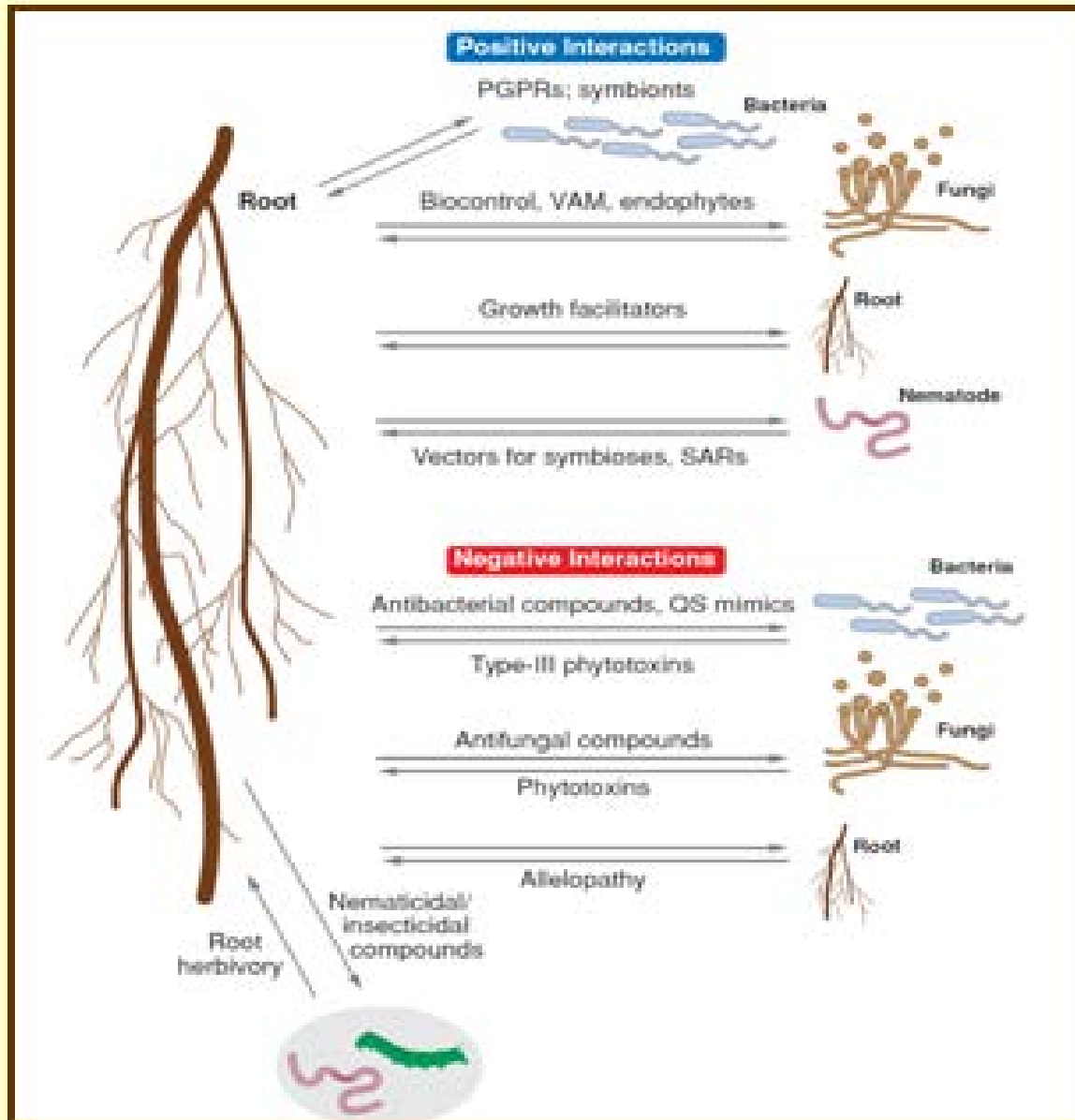
La planta actúan en conjunción integrada con el medio para tener ventajas de una mayor supervivencia y de ser mas competitiva.

Mecanismo de liberación de autoinductóres como acil – homoserina- lactina(AHLs).

Plantas transgénicas que producen inductores, aun cuando otras plantas exudan compuestos que eliminan inductores

Ventajas en un futuro : disminuir el uso de bactericidas químicos que pueden ser contaminantes

Interacción planta-microorganismo en la rizosfera



Prácticas agronómicas en cultivo de leguminosas que explotan procesos biológicos

Prácticas agronómicas

Procesos biológicos

Rotación de cultivos
Cultivos mixtos
Abono en verde



Reduce el uso de fertilizantes

Fijación de nitrógeno



-Infección por rizobios: específicos infectivos y efectivos
-Desarrollo del nódulo

Control biótico y abiótico

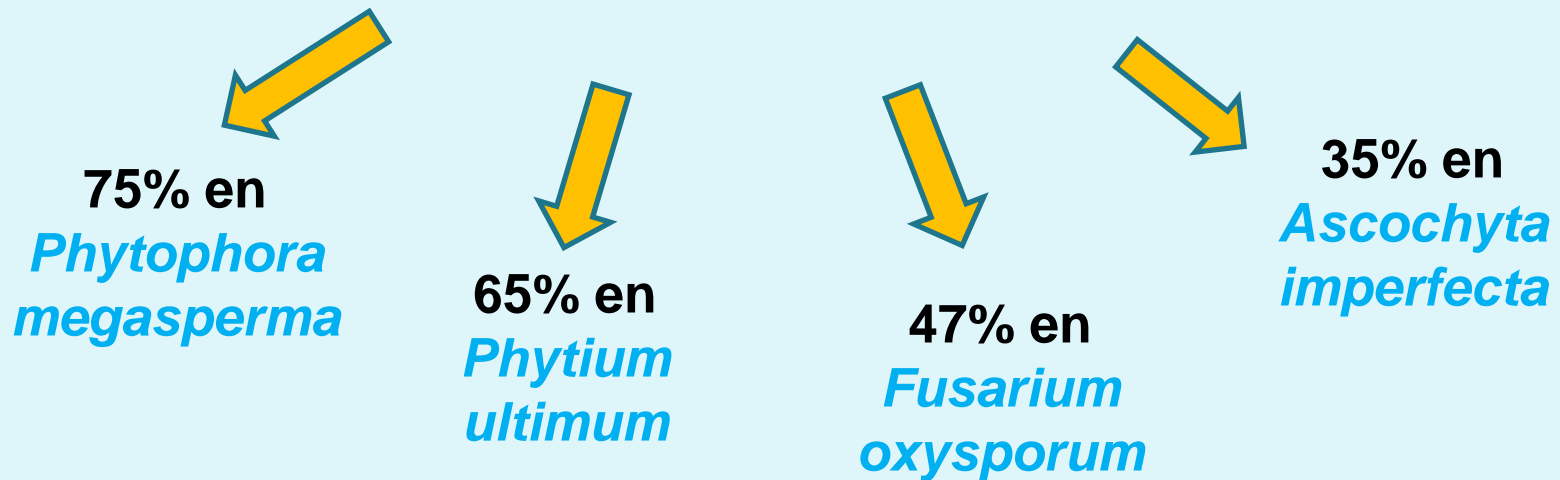


Control patógenos: Disminuye la esporulación
Descontaminación de suelos: Absorción de Metales ó degradación enzimas liticos

Control de patógenos



- *Rhizobio* es el mayor agente de biocontrol en ecosistemas naturales y agrícolas
- *Brayrhizobium japonicum* puede causar la disminución esporulación del :



Interés de las leguminosas

Descontaminación de suelos. Control abiótico

Absorbiendo directamente los contaminantes

| Planta | Contaminante |
|------------------|--|
| <u>alfalfa</u> | Difenilos policlorados DDT, DDE, DDD |
| <u>Judía</u> | Hidrocarburos aromáticos Clorobencenos Hexaclorociclohexanos |
| <u>Lentejas</u> | Difenilos polibromados |
| <u>Cacahuete</u> | Hidrocarburos aromáticos Dinitroanilinas |
| <u>Soja</u> | Hexaclorociclohexanos Fenoles y nitrofenoles Carbamatos y organofosforados |

Facilitando la degradación de los contaminantes

| Planta | Contaminante |
|-----------------|---|
| <u>Guisante</u> | Diazinon |
| <u>Trébol</u> | Tricloroetileno |
| <u>Haba</u> | Sulfonamidas |
| <u>Judía</u> | Paration Diazinon |
| | Enzimas: hidrolasas, lacasas, Nitrolasas, DHs, esterasas |

Interés de las leguminosas

Son integrantes de la dieta humana y ganadera desde 10.000 años (textos sumerios, jeroglíficos egipcios, depósitos arqueológicos)

Sintetizan numerosos metabolitos secundarios que se utilizan como:

Alimentos nutraceuticos : resverastrol (poliofenol), fitoestrógenos, antiinflamatorios , antiulcerosos, antihipertensivas etc.

Biocarburantes: Ricas es lípidos. resinas y taninos

Fitoextracción, fitoremediación y fitodegradación

Piensos ganado y piscifactorias


Interés de las leguminosas

Implantación

Reducción uso
de fertilizantes

Ecosistemas: Pastos y
forraje, Revegetación

Mejora del suelo
Ciclado de
nutrientes



35-45% proteínas
40% CHs, fibra
antioxidantes



Leguminosas grano
y forrajeras

Reduce la
contaminación
ambiental

-Norte de África
-América Central
-América del Sur
-India y Pakistán
MEDITERRANEA

Rotación de
cultivos
legumbre-cereal
Abono verde

Interés de las leguminosas



Alimentación
grano



Interés
forrajero



Producción
de aceite



Ornamentales



Grano y forrajeras

Interés agronómico

Haba, altramuz, guisantes
Leguminosas grano
(nódulos indeterminados)

M. sativa (alfalfa) y *M. truncatula*
Leguminosas forrajeras
(nódulos indeterminados)

Judía y Soja
Leguminosa grano
(nódulos determinados)

Lotus japonicus, *Trifolium*
Leguminosas forrajera
(nódulos determinados)

Garbanzo y Cacahuete
Leguminosa grano

Interés genómico

Se conoce la secuencia completa del genoma de las leguminosas y de los rizobios

Medicago truncatula
Lotus japonicum

Phaseolus vulgaris
Medicago sativa
Lupinus angustifolius

Genómica: Reducido el costo de secuenciación

Glycine max Soja
piensos ganado
(2010)

Arachis hipogea
Cacahuete (2011)

Cicer arietinum
Garbanzo 2^a cultivo mundial ingesta proteica (2014).

Familia leguminoidea

- Subfamilia Papilionoidea: 90% noduladas
- Subfamilia Mimosoidea: 25% noduladas
- Subfamilia Cesalpinoidea: 3% noduladas

Familia Rizobiaceae :

Géneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*
Mesorhizobium, *Ensifer* (*Sinorhizobium*)
Allorhizobium, *Azorhizobium*
Burkholderia



Descubrimiento de la simbiosis



Leonard Fuchsius

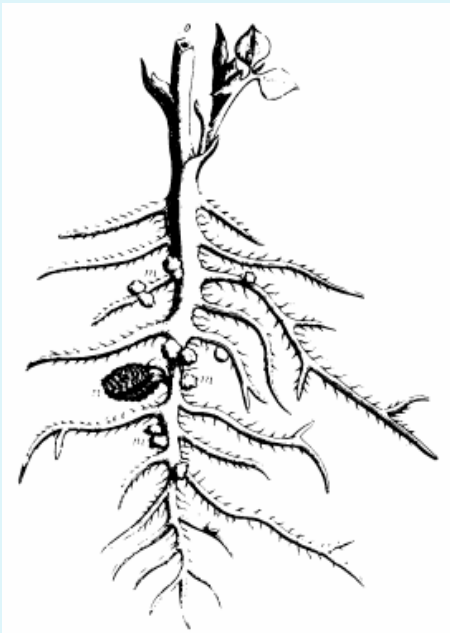
En el siglo XVI **Leonhard Fuchsius** dibujó leguminosas noduladas

En el XVII, Malpighi observó nódulos y filamentos en raíces de judía (*Phaseolus vulgaris*) y de haba (*Vicia faba*).

A finales del XIX el botánico ruso **Woronin** detectó la presencia de bacterias en nódulos de lupino y alisos.

El francés J.B. **Boussingault** demostró que las leguminosas adquirirían más nitrógeno que los cereales de un mismo suelo

Los alemanes **Hermann Hellriegel (1888)** y **Hermann Wilfarth** (químicos) establecieron la capacidad de las leguminosas de utilizar el N_2 del aire en nódulos



Nitrógeno

El nitrógeno es el nutriente más importante requerido por las plantas, su disponibilidad es limitada en muchos suelos, aunque la atmósfera terrestre contiene un 78% en forma gaseosa al no ser reactivo, las plantas son incapaces de utilizarlo.

La utilización de nitrógeno atmosférico por el hombre en la agricultura fue al azar a través de la llamada fijación de nitrógeno industrial.

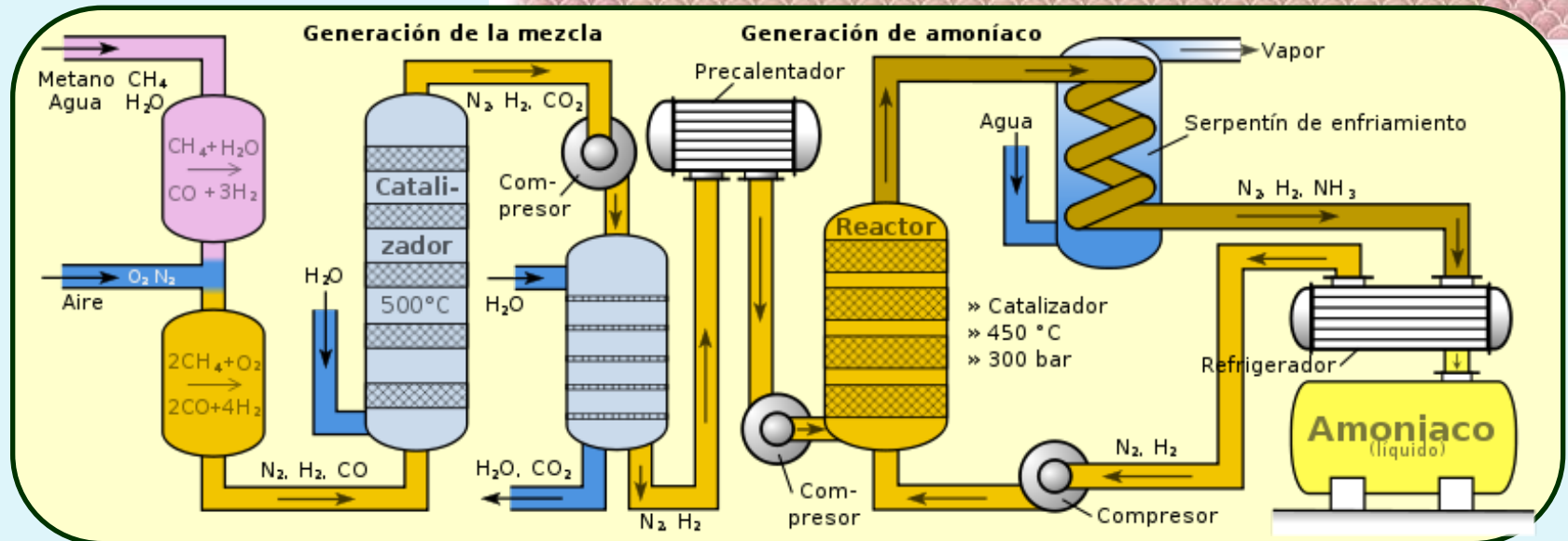
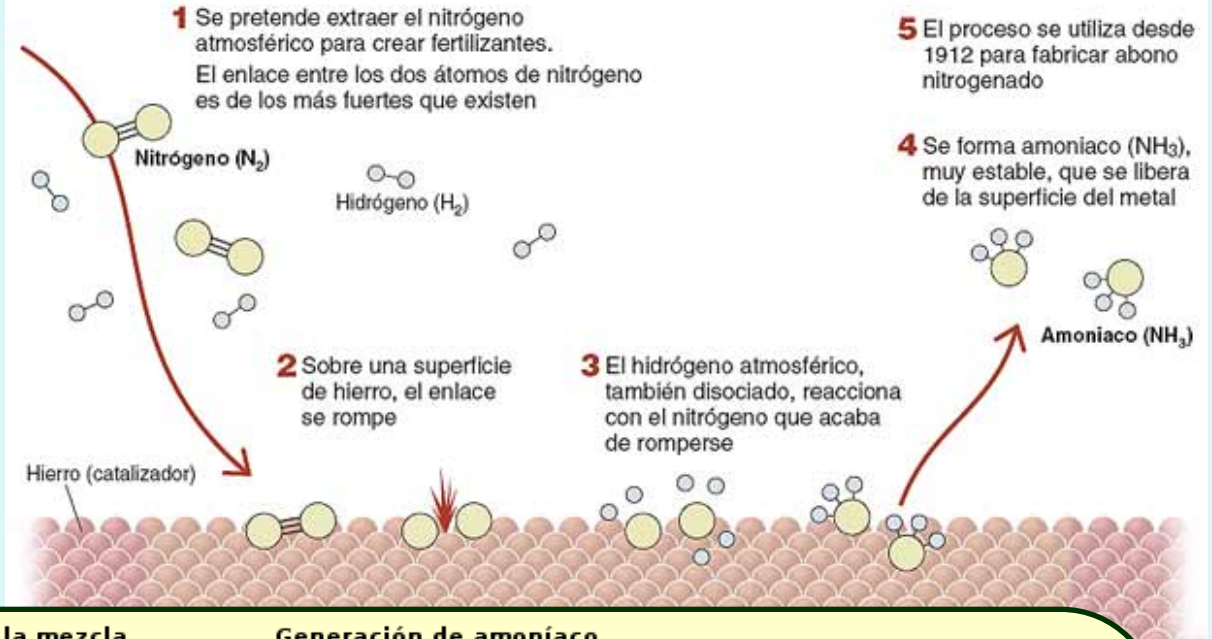
Proceso de Haber-Bosch

1913 BASF

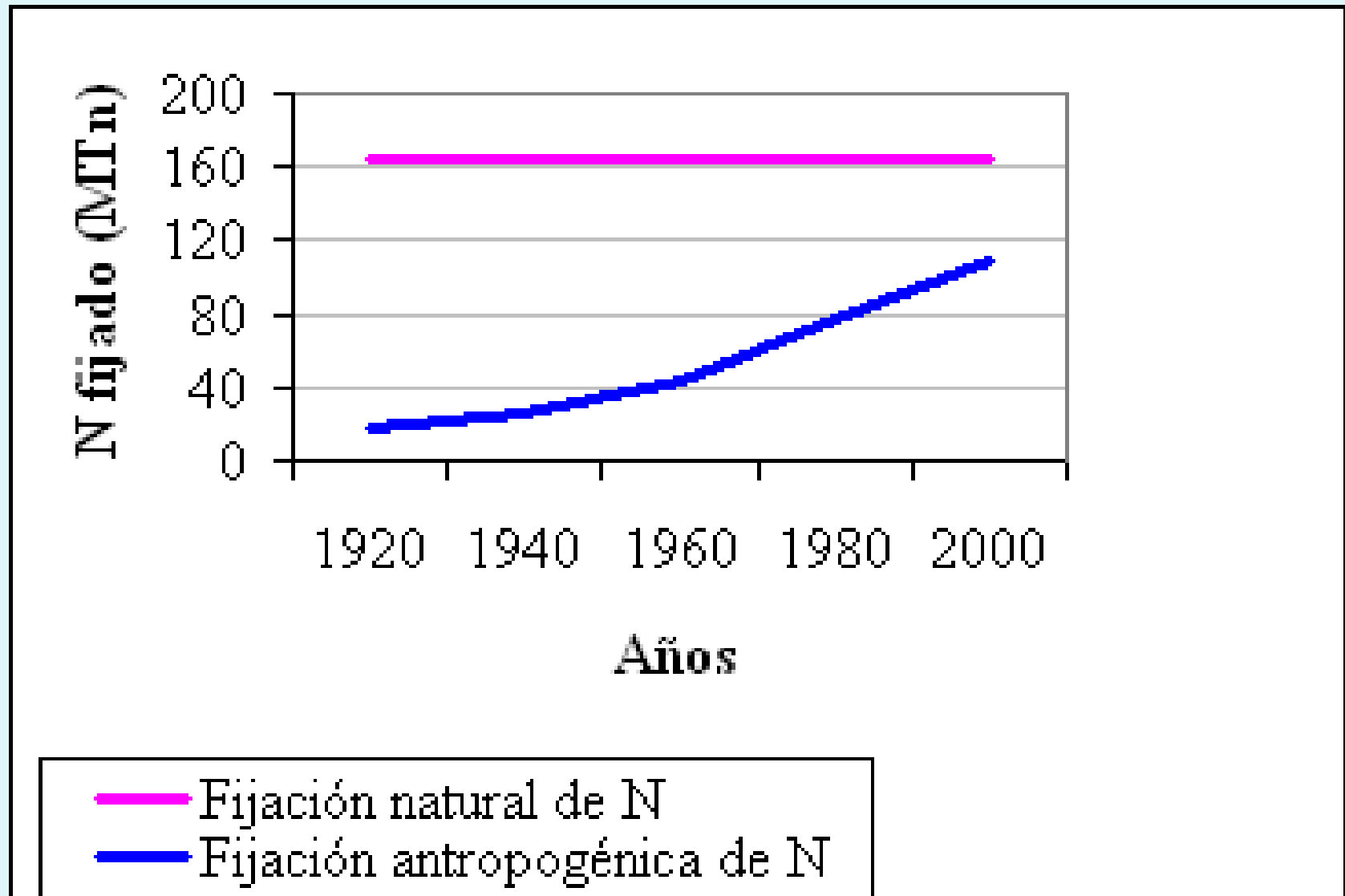


El proceso Haber - Bosch

El nitrógeno del aire se convierte en amoníaco mediante un catalizador de hierro. Es una reacción reversible que fue estudiada por primera vez en detalle por Gerhard Ertl.



N₂ fijado: Haber-Bosch vs fijación biológica de nitrógeno



En los últimos 100 años, la reserva de Nr creado Antropogénicamente se ha incrementado por

1.- Gran aumento en combustión de fósiles (1 Tg en 1860 vs 25 Tg N año en 2000)

2.- Gran incremento fertilizantes (Haber-Bosch):

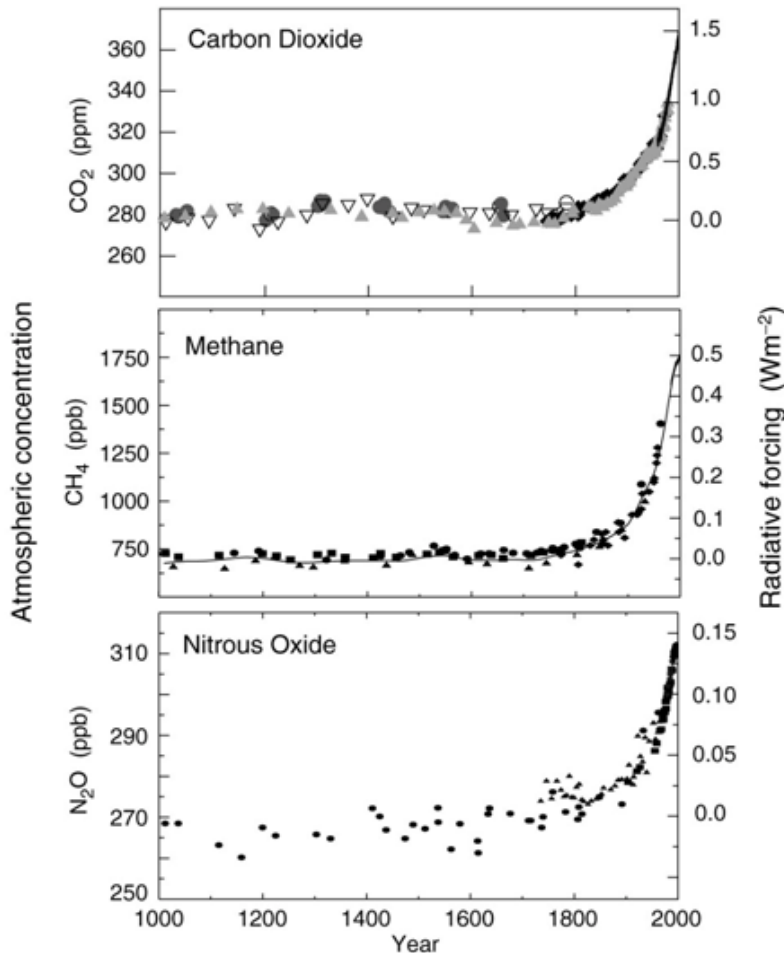
Era cero antes del siglo 20 y en la actualidad 110 Tg N /año.

Hay que asumir que la síntesis de 1 Kg de fertilizante nitrogenado consume 72.8 Mj de energía fósil

En el pasado, el N reactivo (Nr) no se acumulaba en suelo, pues la desnitrificación ocurría al mismo ritmo que la FBN por microorganismos fijadores en vida libre o en simbiosis

Modificaciones en la composición global de la atmosfera debido a la acumulación de gases que impiden la salida de radiación infrarroja debilitando la troposfera (capa de ozono)

(a) Global atmospheric concentrations of three well mixed greenhouse gases



- **Carbon dioxide, methane, nitrous oxide, and other pollutants cause global warming**

- **IPCC concludes increase in these gases is a result of human activities**

Cambio climático y fijación de nitrógeno

Source: Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) Report: Summary for Policy Makers,

La ONU define al **CAMBIO CLIMATICO** como un cambio atribuido a la actividad humana (uso de fertilizantes, actividad antropogénica y ganadera) que altera la composición de la atmósfera.

El **Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC1979 Génova)** implica al CO₂, al CH₄, los NO y los CFC, como responsables del aumento de Tº y del efecto invernadero que son devastadores.

El último informe del IPCC del 2014 señala “que por primera vez en la historia humana la concentración atmosférica de CO₂ superó los 400 ppm, un umbral que se suponía no debía cruzarse”.

Este aumento de CO₂ está afectando a cultivos de trigo en campo puesto que el exceso de CO₂ interfiere con el metabolismo de nitrato y inhibe la formación de proteínas y afecta a la calidad de los alimentos.

La adaptación al cambio climático requiere adoptar prácticas agrícolas que reduzcan los fertilizantes nitrogenados, químicamente sintetizados.

Priorizar la Fijación Biológica de Nitrógeno como proceso respetuoso con el medio ambiente.

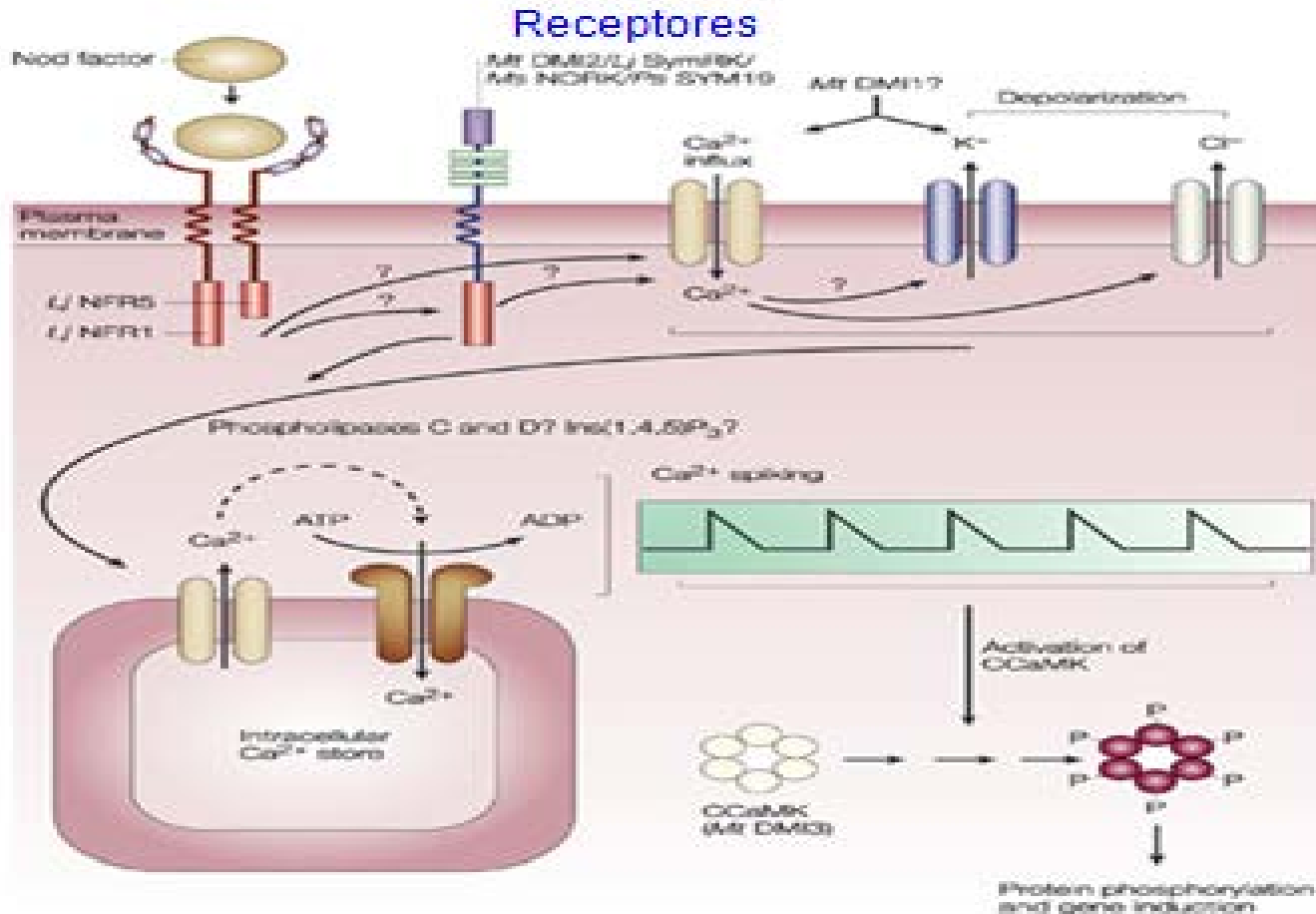
Algunas procariotas son capaces de romper el triple enlace del N_2 formar amonio y cederlo a leguminosas en simbiosis que lo integran en proteínas.

Las leguminosas han establecido y desarrollado un sistema rizosferico en el cual se recluta selectivamente bacterias del suelo denominados rizobios para formar una simbiosis mutualista utilizando como medio de comunicación, vía SYM

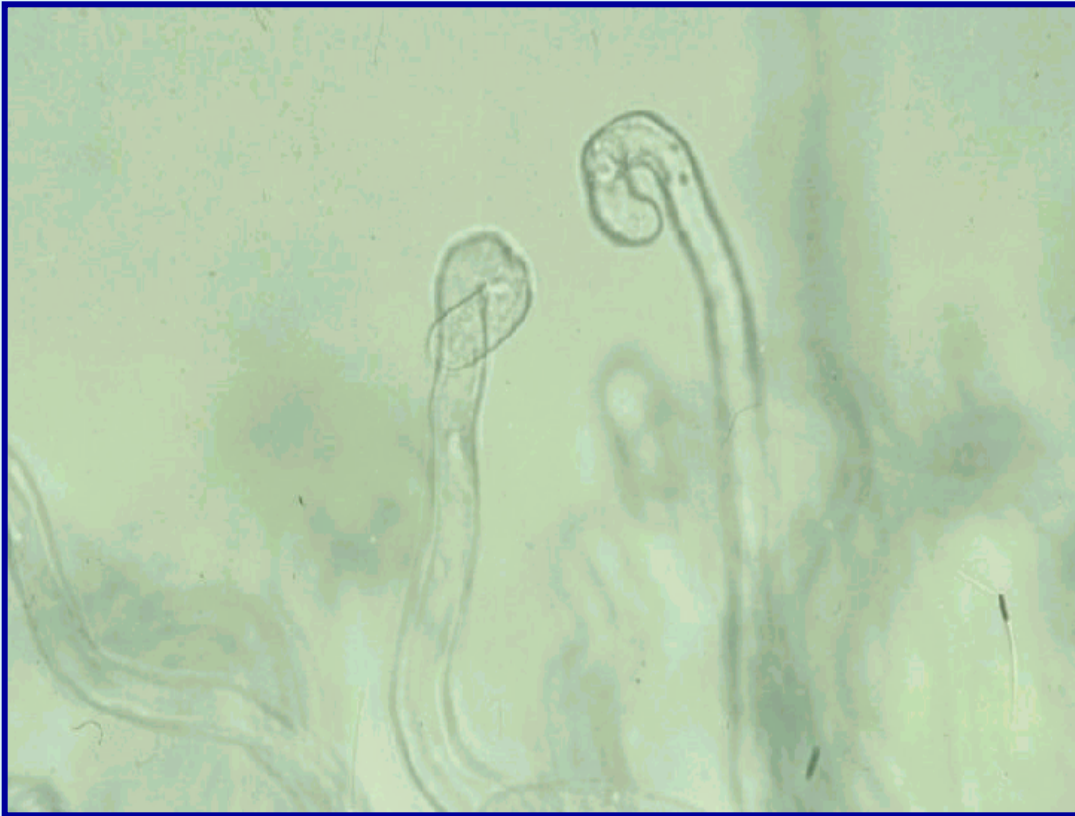


Genes implicados en la entrada del rizobio

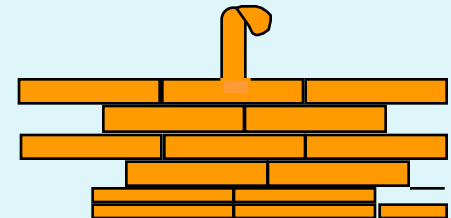
Dos receptores (LRR y LysM), canal de calcio, otro de potasio en la membrana del nucleo , dos nucleoporinas y CCaMK



4.-Curvatura de pelos radicales



Curvatura



Infección de los pelos radicales

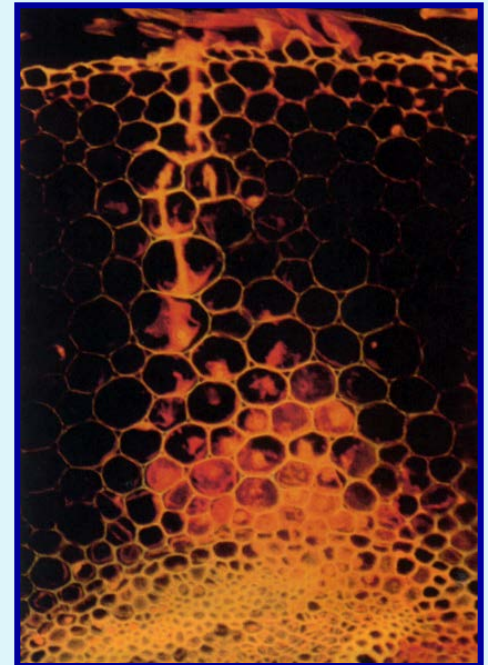
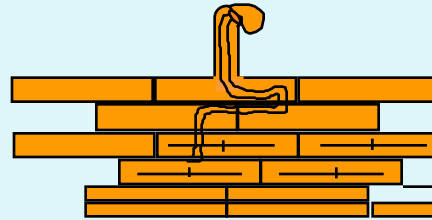
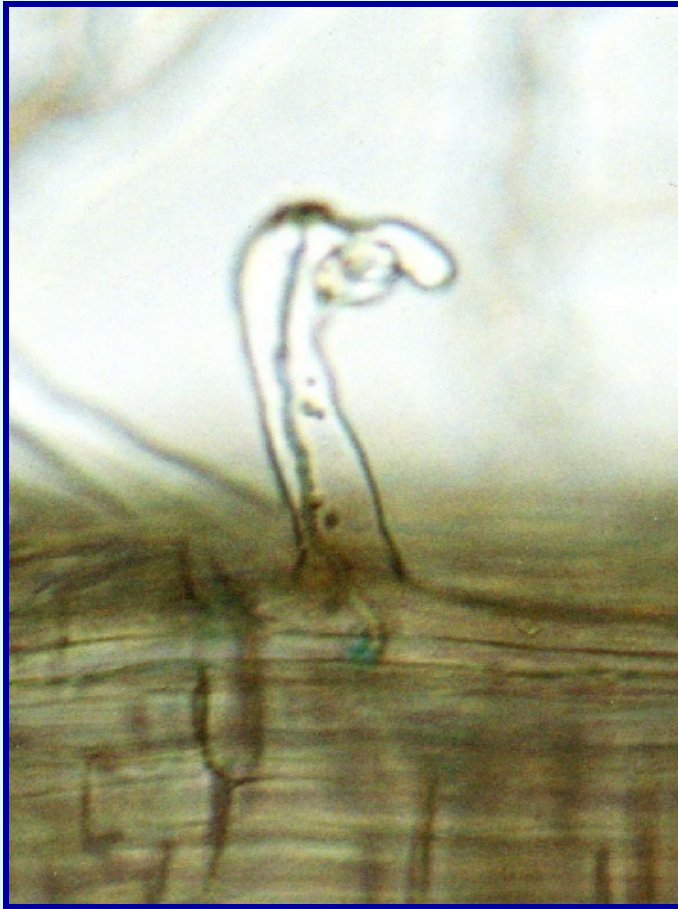


Curvatura del pelo radical



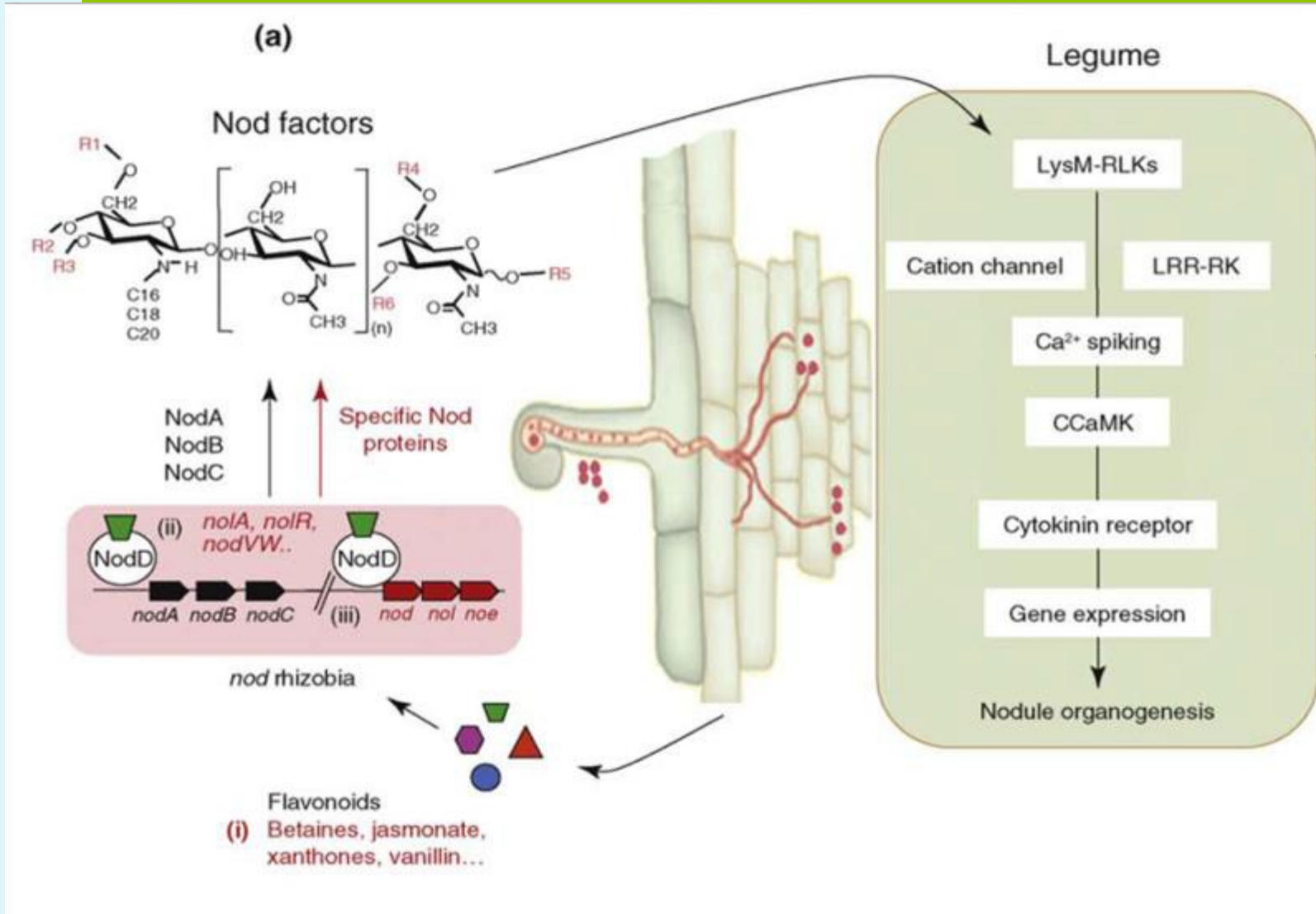
El proceso de infección, se inicia cuando las bacterias son estimuladas por los exudados radicales y proliferan, lo que induce un alargamiento y encurvamiento de los pelos radicales y posterior formación de una estructura tubular llamada cordón de infección.

5.- Formación del cordón de infección: se inicia simultáneamente a la división celular en la corteza radical (meristemo nodular)

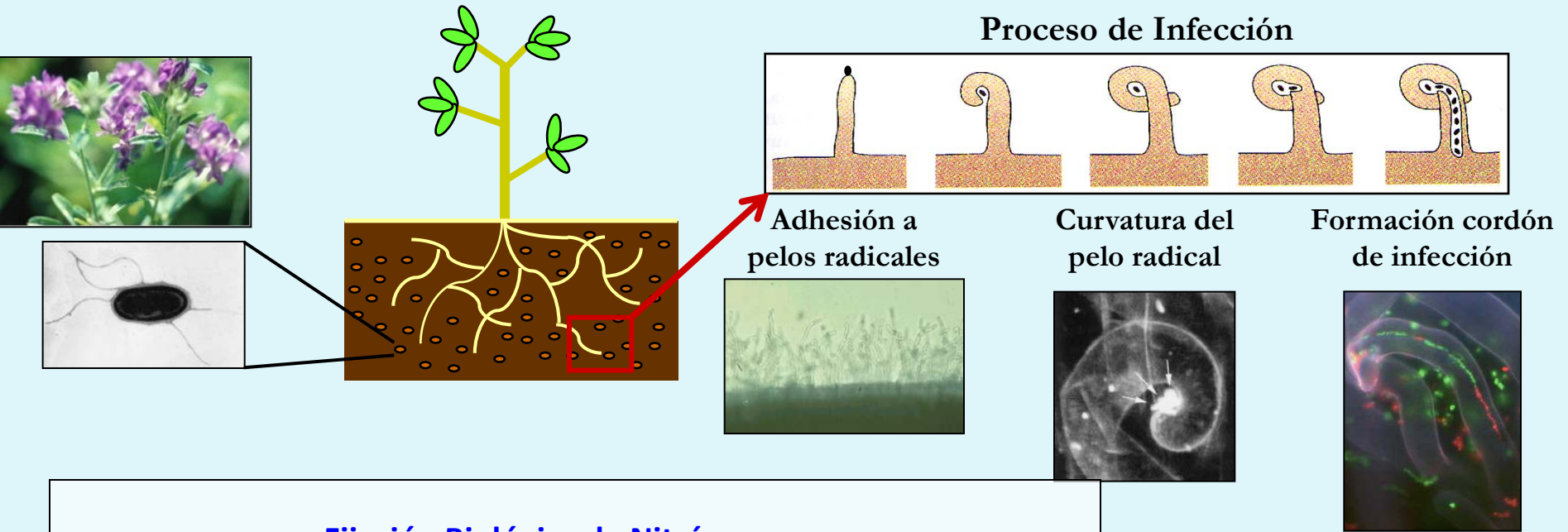


Genes implicados en la nodulación:

nod específicos (*nod FE*, *nod H*, *nod PG*, genes *exo*, *lps*)



Esquema del proceso Simbiosis *Rhizobium*-Leguminosa

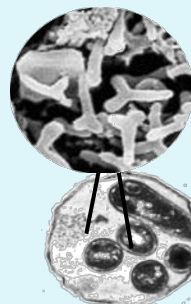


Fijación Biológica de Nitrógeno

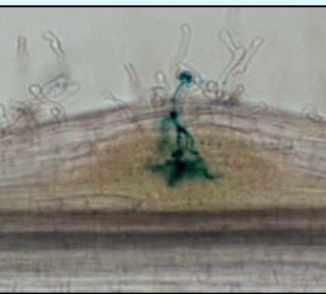
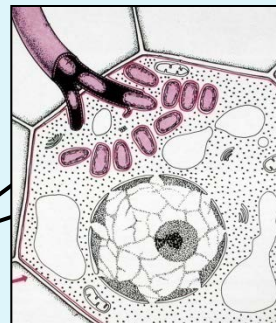


Nodulos

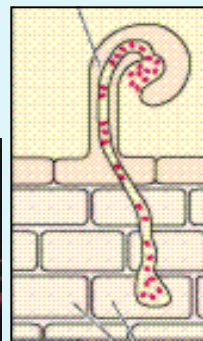
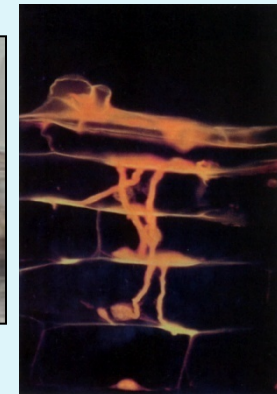
Bacteroides



Simbiosomas

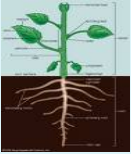


Primordio nodular



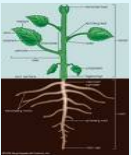
Cortex

Plant-*Rhizobium* long dialogue



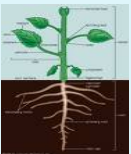
There are specific phenolic compounds for my favorite *Rhizobium*!!!

What are those?!!!! Yeah, they are what I like!!!
Let's go near that plant, and express NOD factors !!!!



You are welcome to be hosted in cortex cells!!! Let's penetrate!!

Let's fix N_2 !!!!



Thanks, for Ammonia!!!

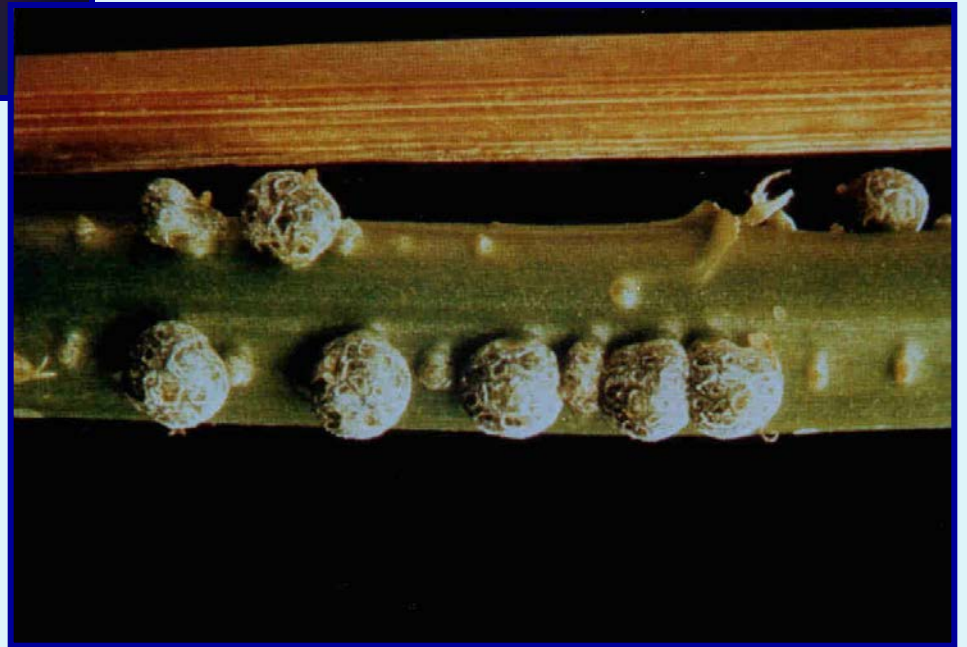
Thanks too for sucrose and nice hospitality!!!



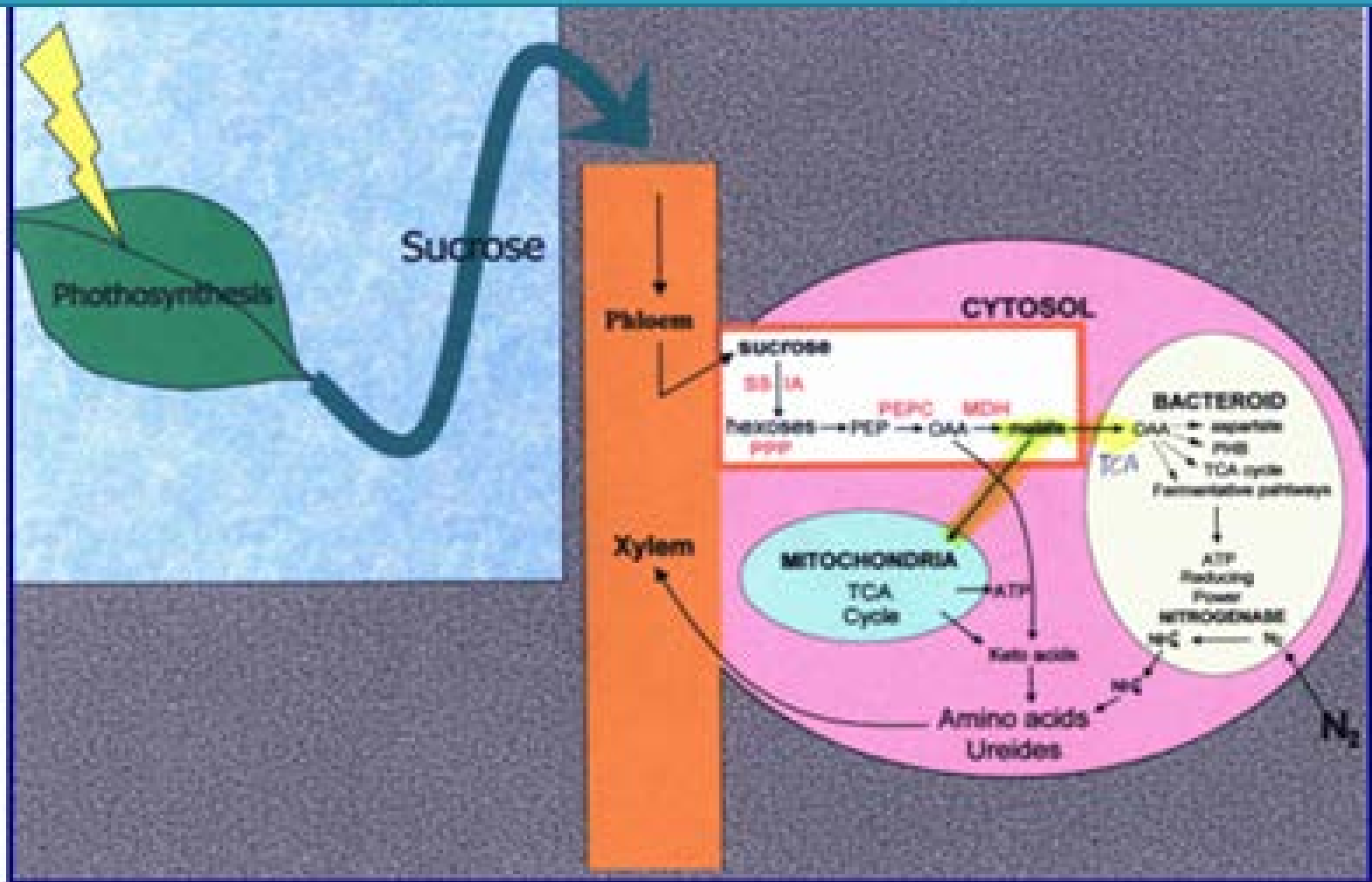
7. Formación del nódulo



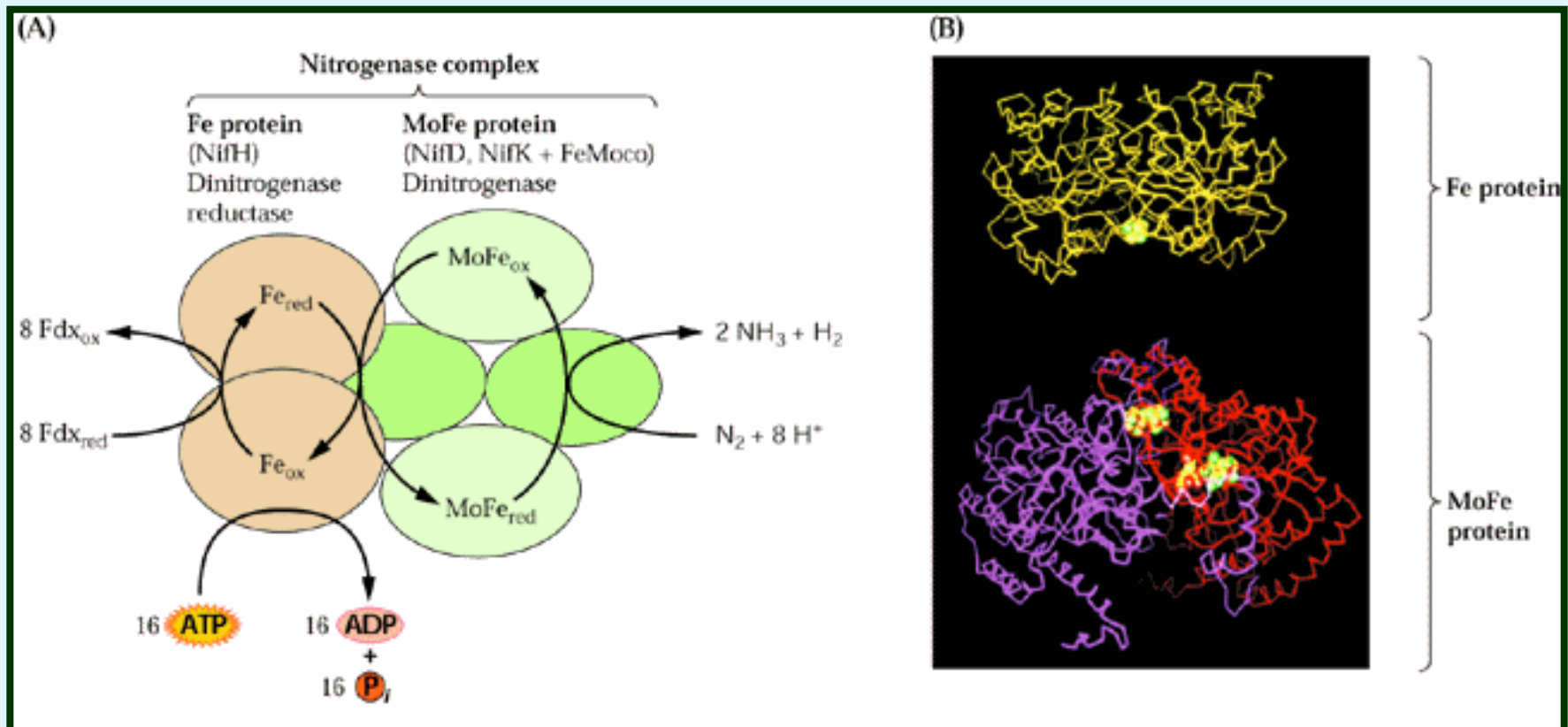
7. Formación del nódulo



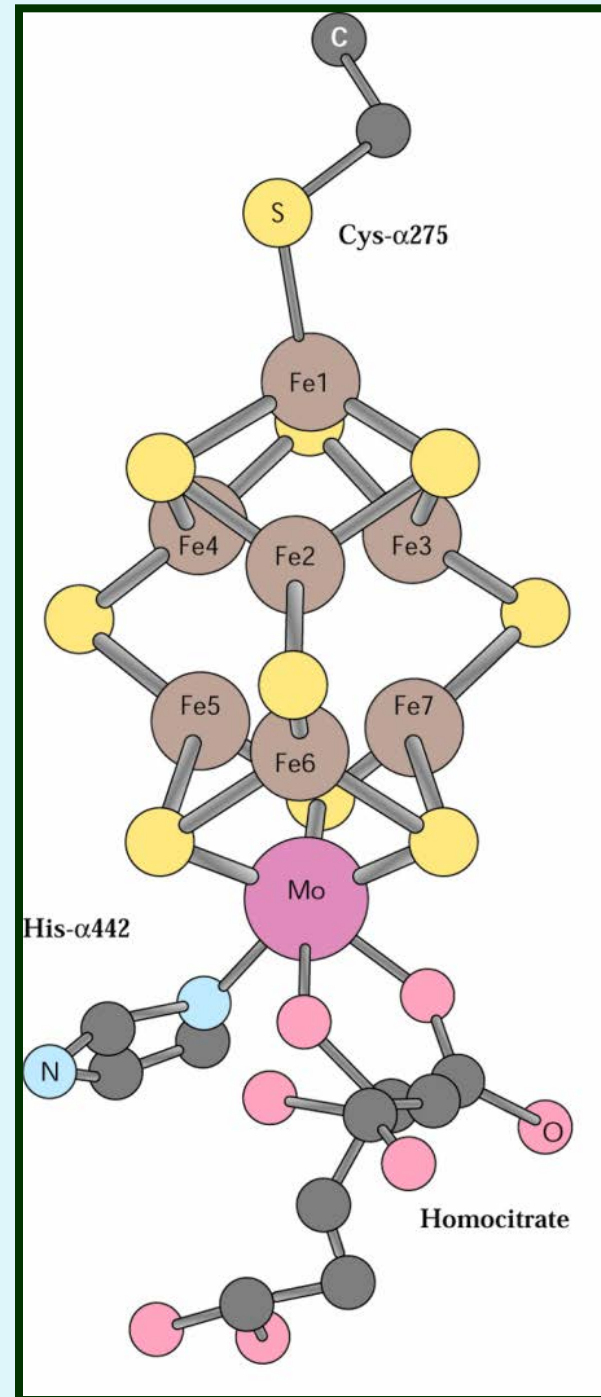
La bacteria se transforma en bacteroide queda envuelta por una membrana de origen vegetal, el metabolismo de CHs cambia solo utiliza Ac. dicarboxilico (planta) es anaeróbica y sintetiza Nasa.



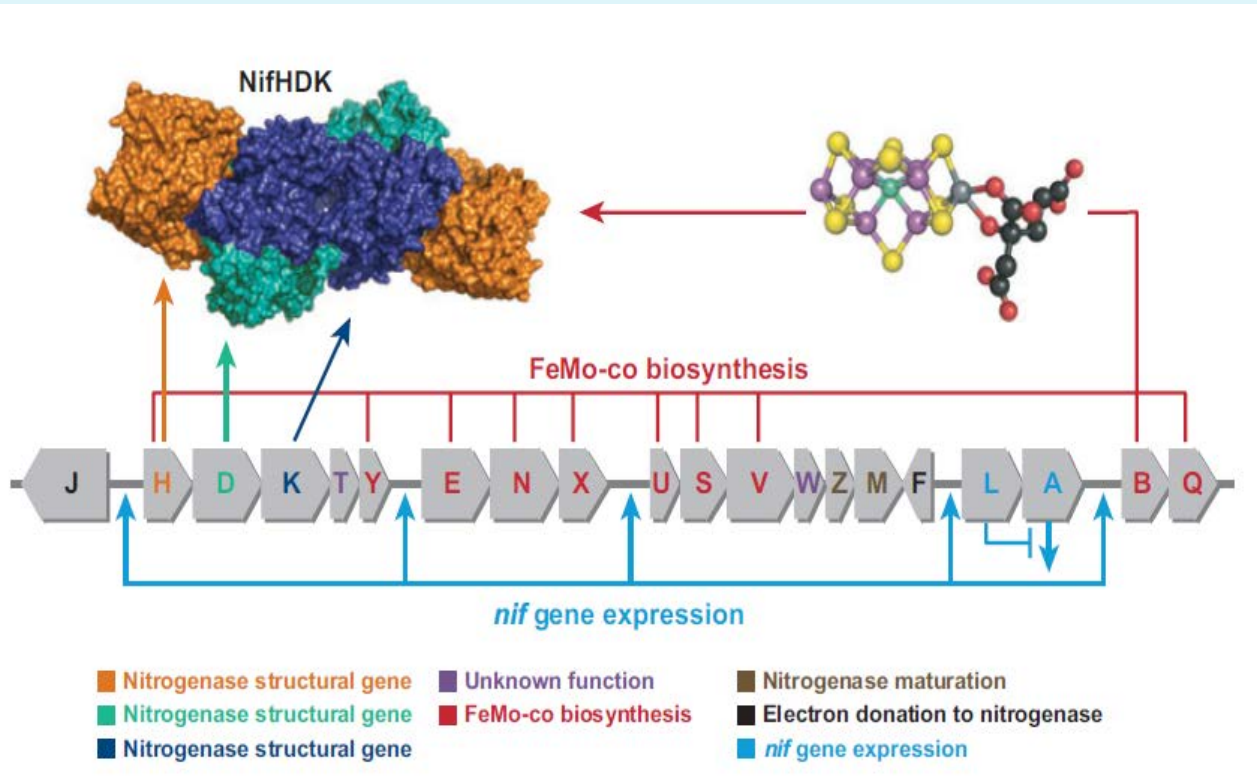
Nitrogenasa



Molecular
model of FeMoco
present in all
symbiotic bacteria



Genes en la síntesis del FeMoCo



Existen 20 genes *nif*:
J, H, D, K, T, Y, E, N, X, U, S,
V, W, Z, M, F, L, A, B, Q
organizador en varias
unidades transcripcionales
o clúster.

Las proteínas implicadas en la biosíntesis de FeMo-co pueden ser :

- Moléculas andamio (**NifU, Nif B y Nif EN**) donde FeMo-co se ensambla
- Metalocluster proteicos (**Nif X y Naf Y**) que llevan precursores de FeMo-co al lugar apropiado del ensamblaje
- Enzimas (**Nif S, Nif Q y Nif V**) que suministran azufre, molibdeno (Mo) y homocitrato como sustrato para la síntesis del cofactor.

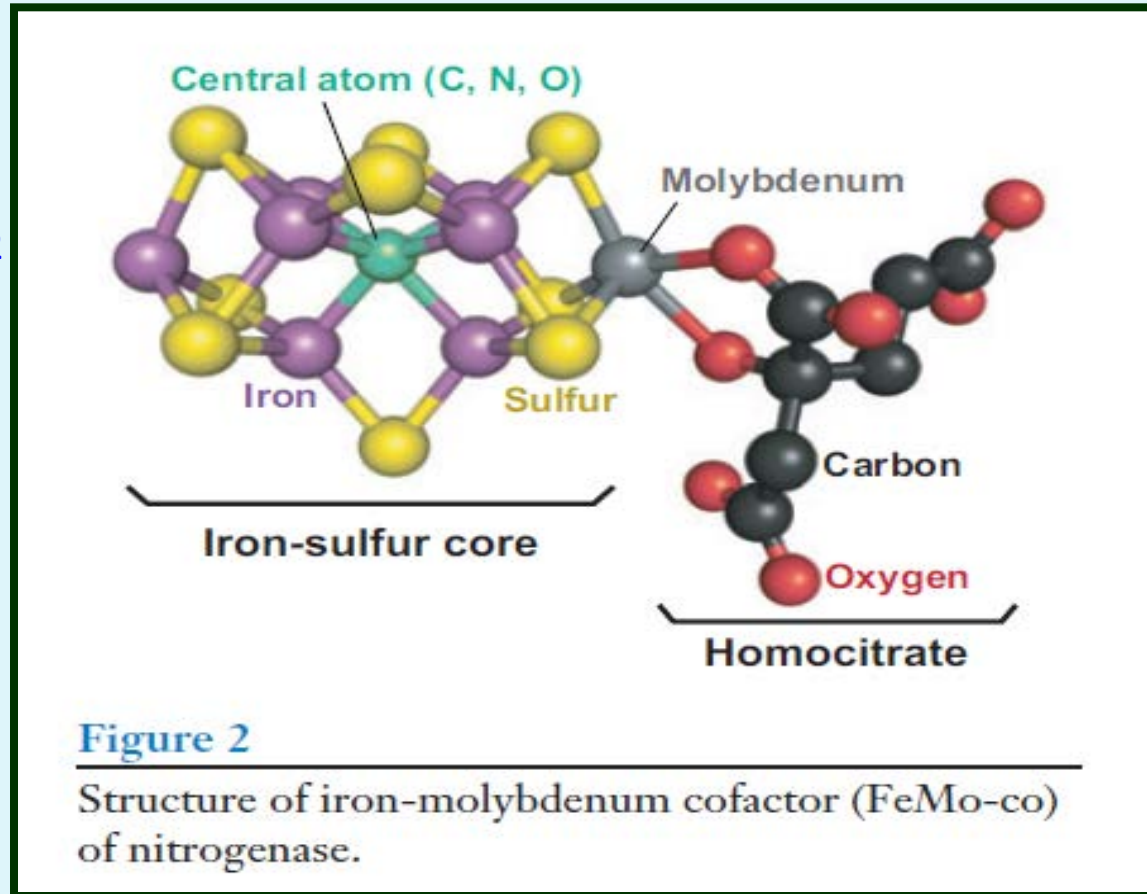
Estructura del FeMo-Co

El **FeMo-co** es necesario para la nitrogenasa porque rompe el triple enlace de N_2

Está compuesto por una **porción inorgánica** $Mo-Fe_7-S_9-X$ y el **ácido orgánico** R- homocitrato

También se describe como un núcleo de **Fe_6-S_9** encapsulado por un átomo de Mo y otro de Fe

Este FeMo-co se inserta en la apo-Nif DK para formar la nitrogenasa



Mecanismos protectores de las nitrogenasa al oxígeno

- Microaerofilia
- Protección respiratoria
- Protección conformacional
- Inhibición reversible
- Síntesis de la nitrogenasa
- Separación espacial
- Barrera a la difusión: leghemoglobina



NÓDULO DE LEGUMINOSA



NÓDULO DE RAIZ DE SOJA

Posibilidad de Transferir el Sistema Fijador de Nitrógeno a otros cultivos: cereales

En 1917 **Burrill y Hansen**, de la Universidad de Illinois, especularon con la posibilidad de lograr la simbiosis entre la bacteria de las leguminosa con otras no-leguminosas.

En 1971 **Prof. Daniel Arnon** (Berkeley) predijo que en 10 años **se habría** desarrollado un método que capacite la fijación de nitrógeno, en el cloroplasto compartiendo ambos procesos noche y día .

En 1970 **Norman Bourlaug** Premio Nobel de la paz en Oslo ,
Rhizobium cerealis

Actualmente con los conocimientos que se tienen, ambicionar la transferencia del sistema fijador de nitrógeno a otros cultivos es un reto para la investigación

Dr. Gary Stacey Universidad de Missouri mediante **a)** eliminación del mecanismo de Respuesta a la Inmunidad Innata (MAMPs) **b)** la entrada del rizobio vía grieta **c)** la transferencia de los genes simbióticos de reconocimiento (SYM) comprobando que los cereales responde a las redes de comunicación del rizobio.

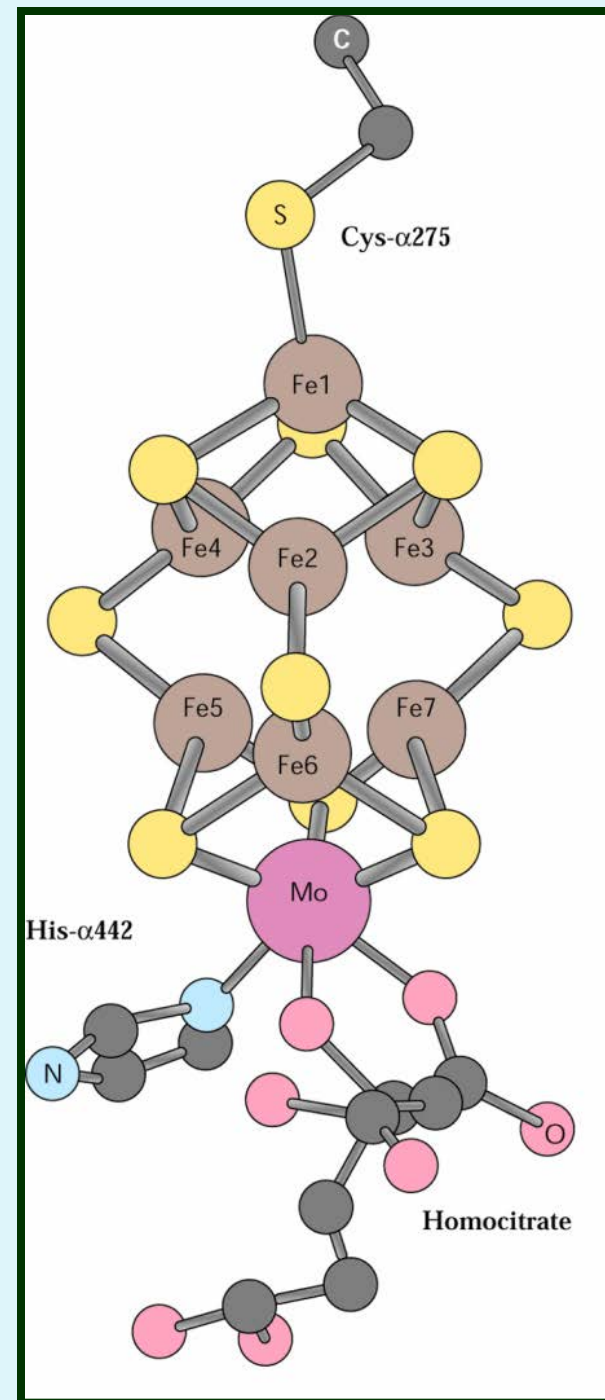
Dr. Pakrasi Centro de Energías Renovables y Sostenibilidad Universidad de Washington (San Luis) en 2013 recibió una subvención (USA-UK) Transferir 30 genes de una cianobacteria (fijadora de N₂), al cloroplasto vegetal con un control del reloj circadiano.

Dr. Luis Rubio CBGP UPM, en 2012 recibió de la Fundación Bill y Melinda Gates 3.5 millones de Euros

Pretende la transferencia directa de los genes *nif* implicados exclusivamente en el funcionamiento del Cofactor de Molibdeno, sitio activo de la enzima (FeMoco)

La purificación de las proteínas implicadas han permitido desarrollar una **nitrogenasa híbrida *in vitro*** reemplazando al FeMoco por uno de sus intermediarios.

Esta construcción *in vitro* ha evidenciado los genes *nif* necesarios para sintetizar el cofactor, (solo requiere 10 de ellos) la concentración de proteínas estructurales y biosintéticas de la enzima en condiciones diazotroficas y sus variaciones en el tiempo.





Medio Ambiente y Leguminosas



Reduce los inputs de fertilizante Presente en numerosos ecosistemas



**Simbiosis Rhizobium –
Leguminosa
Fijación de Nitrógeno**



**Disminuye la contaminación
ambiental**



**Rotación de cultivos
y Agricultura sostenible**