

Interacciones planta-microorganismo

Pedro F. Mateos, M^a Encarnación Velázquez, Raúl Rivas, Eustoquio Martínez-Molina

Departamento de Microbiología y Genética. Universidad de Salamanca

pfmng@usal.es

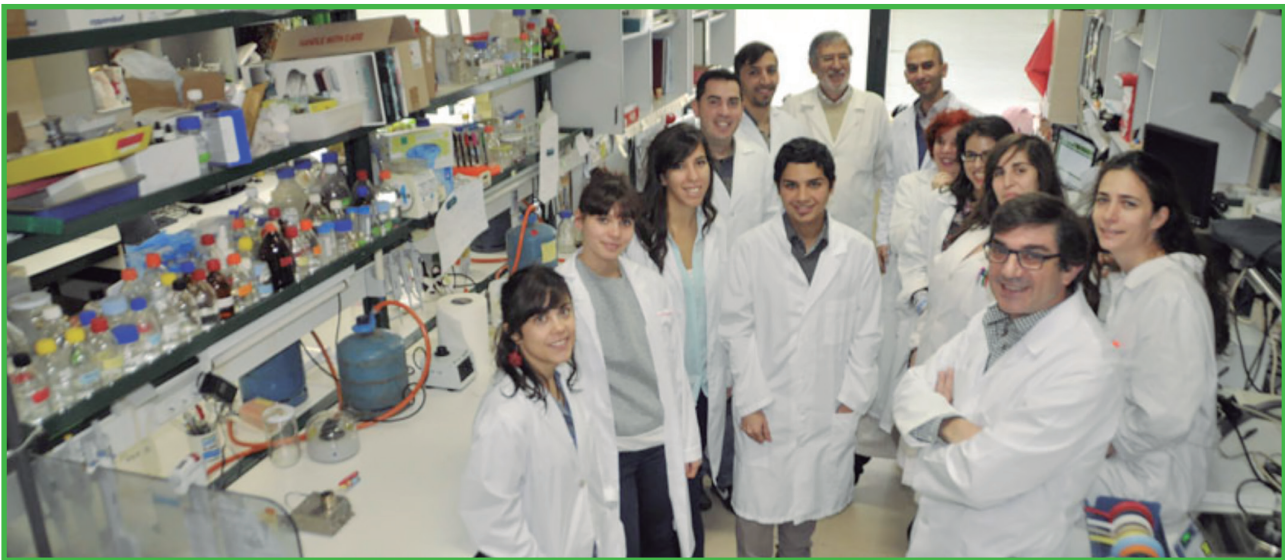


Foto de grupo. Algunos de los miembros del grupo «Interacciones Planta-Microorganismo» (de izquierda a derecha): Marta Marcos, Alexandra Díez, Lorena Celador, Xavier Cruz, José David Flores, Sergio Sánchez, Eustoquio Martínez-Molina, Raúl Rivas, M^a Encarnación Velázquez, Lucía López, Esther Menéndez, Paula García y Pedro Mateos.

El Grupo de Investigación Reconocido (GIR) de la Universidad de Salamanca, «INTERACCIONES PLANTA-MICROORGANISMO» se formó y comenzó sus trabajos en la década de los 80, tras la incorporación del Dr. Martínez Molina al Departamento de Microbiología de la Universidad de Salamanca. Desde entonces, el grupo ha crecido y se ha consolidado plenamente, estableciendo colaboraciones productivas y estables con diversos grupos de investigación tanto en España como en el extranjero (EEUU, Inglaterra, Francia, Portugal, Italia, Brasil, Perú, etc.). Además, el grupo tiene el estatus de Unidad Asociada al Departamento de Producción Vegetal del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Salamanca del CSIC y ha sido reconocido como Grupo de Excelencia y como Unidad de Investigación Consolidada por la Junta de Castilla y León, formando parte de la Red Nacional de Biotecnología de las asociaciones beneficiosas ente plantas y microorganismos (BIO2009-

05735-E) desde su inicio y siendo grupo fundador de la Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN).

En nuestra opinión, la innovación tecnológica no debe llevarse a cabo a costa de un impacto negativo en el medio ambiente y debe garantizar una gestión sostenible. Por supuesto, el sector agrario no es una excepción y demanda la consolidación de una oferta científica que provoque que la dicotomía entre investigación y desarrollo tecnológico sea cada vez menos evidente. Durante las últimas décadas, nuestro grupo de investigación ha trabajado en este sentido estudiando maximizar la eficacia y productividad de diversos cultivos, ya sea utilizando investigación básica con plantas modelo o investigación aplicada con ensayos de campo. Así, la experiencia acumulada desde hace más de 30 años en el campo de las «Interacciones beneficiosas planta-microorganismo» nos permite afrontar los retos tanto de formación de investigadores como de ejecución

de proyectos básicos y aplicados. En este sentido, durante estos años hemos obtenido financiación para más de 60 proyectos, en convocatorias competitivas tanto nacionales como internacionales y de entidades financiadoras como MEC, DGICYT, FEDER, Junta de Castilla y León, etc., así como derivada de contratos con empresas privadas, que han dado como resultado numerosas publicaciones científicas, más de 10 patentes y la formación de más de 25 doctores.

Entre las aportaciones realizadas por el grupo podemos destacar las siguientes: (a) Análisis de las bases moleculares de las interacciones simbióticas mutualistas microorganismo planta, especialmente el caso *Rhizobium*-leguminosa; (b) Estudio de la biodiversidad, caracterización y análisis de la estructura taxonómica de las poblaciones microbianas implicadas en interacciones con plantas y análisis de poblaciones endófitas de vegetales; (c) Mejora de la producción primaria mediante el diseño y utilización de biofertilizantes microbianos multifuncionales en cultivos de leguminosas y no leguminosas (d) Análisis de agentes de biocontrol directos e indirectos que favorecen la inducción de respuesta defensiva en la planta y (e) Fijación biológica de nitrógeno.

Estas aportaciones han dado lugar a más de 100 artículos en revistas científicas de prestigio (PNAS, ISME, SR, MPMI, SBB, AEM, SAM, IJSEM...) y más de 50 capítulos de libro en editoriales como Elsevier, Wiley, Springer, CRC, etc.; Asimismo hemos presentado más de 200 comunicaciones escritas y más de 50 ponencias en congresos tanto nacionales como internacionales.

En la actualidad las líneas de trabajo que nuestro grupo desarrolla en el ámbito de la interacción beneficiosa microorganismo-planta se pueden resumir en las siguientes:

1. Estudio de la biodiversidad, caracterización y análisis de la estructura taxonómica de poblaciones microbianas implicadas en interacciones microorganismo-planta y análisis de su potencial biotecnológico. Hemos aplicado diferentes técnicas, algunas de ellas desarrolladas en nuestro grupo de investigación como los perfiles de LMW RNA y TP-RAPD, al estudio de dichas poblaciones y hemos desarrollado bases de datos de diferentes grupos de rizobia para MALDI-TOF MS, una técnica que permite la identificación rápida de estas bacterias. Como consecuencia de este tipo de estudios hemos descrito 7 nuevos géneros y más de 50 nuevas especies de bacterias aisladas de diferentes ecosistemas, así como 4 simbiovariedades ligadas a diferentes especies y géneros de rizobia que interactúan con distintas leguminosas.
2. Análisis molecular del sistema de celulasas microbianas en la interacción *Rhizobium*-leguminosa y sus aplicaciones biotecnológicas. Hemos comprobado que la celulasa CelC2 de *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii es esencial en el proceso de infección canónico en trébol, ya que genera un orificio específicamente en el ápice no cristalino del pelo radical, por el cual penetra la bacteria. Por otra parte, el gen *celC*, se encuentra muy conservado dentro del género

Rhizobium y su sobreexpresión provoca la formación de canales de infección y nódulos aberrantes y un aumento de la competitividad de las bacterias. Estos fenotipos son resultado de la hidrólisis incontrolada de la celulosa no cristalina, cuya distribución en la planta se restringe a los puntos de infección primaria y secundaria. Además, la aplicación del enzima purificado altera el patrón de los pulsos de calcio inducidos por los factores de nodulación y la expresión de las nodulinas tempranas lo que origina una disminución en el número de nódulos. Estos datos corroboran la importancia de una estrecha regulación en la producción de enzimas degradativos de la pared celular vegetal en los rizobios para que la nodulación sea efectiva. Por último, también hemos observado que la celulasa CelC2 está involucrada en la biosíntesis de celulosa en *Rhizobium*, que actúa a su vez en la formación de biopelículas tanto *in planta* como *in vitro*. Todos estos resultados confirman la funcionalidad de la celulasa CelC2 en la colonización, infección y nodulación durante el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno en leguminosas.

3. Mejora de la producción primaria en cultivos de leguminosas y no leguminosas mediante el diseño y utilización de inóculos bacterianos como biofertilizantes multifuncionales. Para lograr este objetivo, empleamos diferentes tipos de bacterias que engloban grupos tan diversos como los bacilos Gram positivos esporulados, actinobacterias y los rizobia. En este último caso, el género *Rhizobium* y otros géneros relacionados, además de penetrar a través de los pelos radicales de leguminosas para formar nódulos fijadores de nitrógeno, son importantes endofitos en cereales y otras plantas. Por ello, en los últimos años hemos centrado nuestro interés en su aplicación también en cultivos de no-leguminosas. De hecho, nuestros estudios demuestran la capacidad de promover el crecimiento vegetal por los rizobia, en cultivos tan dispares como el maíz, arroz, trigo, lechuga, zanahoria, tomate, pimiento o fresa. Estos hallazgos hacen muy atractiva la aplicación de *rhizobia* como biofertilizantes, ya que hemos comprobado que estos microorganismos tienen un mayor potencial de unión a las raíces de plantas no leguminosas que otros microorganismos.

PUBLICACIONES SELECCIONADAS DE LOS ÚLTIMOS 5 AÑOS

Armas-Capote N, Pérez-Yépez J, Martínez-Hidalgo P, Garzón-Machado V, Del Arco-Aguilar M, Velázquez E, León-Barrios M. (2014). Core and symbiotic genes reveal nine *Mesorhizobium* genospecies and three symbiotic lineages among the rhizobia nodulating *Cicer canariense* in its natural habitat (La Palma, Canary Islands). Syst Appl Microbiol 37:140-8. doi: 10.1016/j.syapm.2013.08.004.

Cobo-Díaz JF, Martínez-Hidalgo P, Fernández-González AJ, Martínez-Molina E, Toro N, Velázquez E, Fernández-López M. (2014). The endemic *Genista versicolor* from Sierra Nevada National Park in Spain

- is nodulated by putative new *Bradyrhizobium* species and a novel symbiovar (sierranevadense). *Syst Appl Microbiol* 37: 177-85. doi: 10.1016/j.syapm.2013.09.008.
- Díaz-Alcántara CA, Ramírez-Bahena MH, Mulas D, García-Fraile P, Gómez-Moriano A, Peix A, Velázquez E, González-Andrés F.** (2014). Analysis of rhizobial strains nodulating *Phaseolus vulgaris* from Hispaniola Island, a geographic bridge between Meso and South America and the first historical link with Europe. *Syst Appl Microbiol* 37:149-56. doi: 10.1016/j.syapm.2013.09.005.
- Ferreira L, Sánchez-Juanes F, García-Fraile P, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, González-Buitrago JM, Velázquez E.** (2011). MALDI-TOF mass spectrometry is a fast and reliable platform for identification and ecological studies of species from family *Rhizobiaceae*. *PLoS ONE* 6: e20223. doi: 10.1371/journal.pone.0020223.
- Flores-Félix JD, Carro L, Velázquez E, Valverde Á, Cerda-Castillo E, García-Fraile P, Rivas R.** (2013). *Phyllobacterium endophyticum* sp. nov., isolated from nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int J Syst Evol Microbiol* 63: 821-6. doi: 10.1099/ijs.0.038497-0.
- Flores-Félix JD, Silva LR, Rivera LP, Marcos-García M, García-Fraile P, Martínez-Molina E, Mateos PF, Velázquez E, Andrade P, Rivas R.** (2015). Plants probiotics as a tool to produce highly functional fruits: the case of *Phyllobacterium* and vitamin C in strawberries. *PLoS ONE* 10: e0122281. doi: 10.1371/journal.pone.0122281.
- Fonseca MB, Peix A, de Faria SM, Mateos PF, Rivera LP, Simões-Araujo JL, França MG, Isaias RM, Cruz C, Velázquez E, Scotti MR, Sprent JI, James EK.** (2013). Nodulation in *Dimorphandra wilsonii* Rizz. (Caesalpinioideae), a threatened species native to the Brazilian Cerrado. *PLoS ONE* 8. doi: 10.1371/annotation/eba72e14-aebd-494f-8121-7eb9fd8da168.
- García-Fraile P, Carro L, Robledo M, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, Fernández MT, Mateos PF, Rivas R, Igual JM, Martínez-Molina E, Peix A, Velázquez E.** (2012). *Rhizobium* promotes non-legumes growth and quality in several production steps: towards a biofertilization of edible raw vegetables healthy for humans. *PLoS ONE* 7: e38122. doi: 10.1371/journal.pone.0038122.
- García-Fraile P, Mulas-García D, Peix A, Rivas R, González-Andrés F, Velázquez E.** (2010). *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two nodC alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. *Can J Microbiol* 56: 657-66. doi: 10.1139/w10-048.
- García-Fraile P, Silva LR, Sánchez-Márquez S, Velázquez E, Rivas R.** (2013). Plums (*Prunus domestica* L.) are a good source of yeasts producing organic acids of industrial interest from glycerol. *Food Chem* 139: 31-4. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.12.043.
- Martínez-Hidalgo P, Flores-Félix JD, Menéndez E, Rivas R, Carro L, Mateos PF, Martínez-Molina E, León-Barrios M, Velázquez E.** (2015). *Cicer canariense*, an endemic legume to the Canary Islands, is nodulated in mainland Spain by fast-growing strains from symbiovar trifolii phylogenetically related to *Rhizobium leguminosarum*. *Syst Appl Microbiol* 38: 346-50. doi: 10.1016/j.syapm.2015.03.011.
- Martínez-Hidalgo P, Galindo-Villardón P, Trujillo ME, Igual JM, Martínez-Molina E.** (2015). Micromonospora from nitrogen fixing nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). A new promising Plant Probiotic Bacteria. *Sci Rep.* 5: 8271. doi: 10.1038/srep08271.
- Martínez-Hidalgo P, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, Rivas R, Igual JM, Mateos PF, Martínez-Molina E, León-Barrios M, Peix A, Velázquez E.** (2015) Revision of the taxonomic status of type strains of *Mesorhizobium loti* and reclassification of strain USDA 3471¹ as the type strain of *Mesorhizobium erdmanii* sp. nov. *And ATCC 33669¹* as the type strain of *Mesorhizobium jarvisii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:1703-8. doi: 10.1099/ijs.0.000164.
- Peix A, Ramírez-Bahena MH, Flores-Félix JD, Alonso de la Vega P, Rivas R, Mateos PF, Igual JM, Martínez-Molina E, Trujillo ME, Velázquez E.** (2015). Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 65:1213-9. doi: 10.1099/ijs.0.000082.
- Robledo M, Jiménez-Zurdo JI, Soto MJ, Velázquez E, Dazzo F, Martínez-Molina E, Mateos PF.** (2011). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Mol Plant Microbe Interact* 24:798-807. doi: 10.1094/MPMI-10-10-0249.
- Robledo M, Rivera L, Jiménez-Zurdo JI, Rivas R, Dazzo F, Velázquez E, Martínez-Molina E, Hirsch AM, Mateos PF.** 2012. Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microb Cell Fact* 11: 125. doi: 10.1186/1475-2859-11-125.
- Robledo M, Velázquez E, Ramírez-Bahena MH, García-Fraile P, Pérez-Alonso A, Rivas R, Martínez-Molina E, Mateos PF.** (2011). The *celC* gene, a new phylogenetic marker useful for taxonomic studies in *Rhizobium*. *Syst Appl Microbiol* 34:393-9. doi: 10.1016/j.syapm.2011.01.010.
- Sánchez-Juanes F, Ferreira L, Alonso de la Vega P, Valverde A, Barrios ML, Rivas R, Mateos PF, Martínez-Molina E, González-Buitrago JM, Trujillo ME, Velázquez E.** (2013). MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for differentiation of *Bradyrhizobium* species: application to the identification of *Lupinus* nodulating strains. *Syst Appl Microbiol* 36:565-71. doi: 10.1016/j.syapm.2013.09.003.
- Silva LR, Azevedo J, Pereira MJ, Carro L, Velázquez E, Peix A, Valentão P, Andrade PB.** (2014). Inoculation of the nonlegume *Capsicum annuum* (L.) with *Rhizobium* strains. 1. Effect on bioactive compounds, antioxidant activity, and fruit ripeness. *J Agric Food Chem* 62:557-64. doi: 10.1021/jf4046649.
- Silva LR, Azevedo J, Pereira MJ, Carro L, Velázquez E, Peix A, Valentão P, Andrade PB.** (2014). Inoculation of the nonlegume *Capsicum annuum* L. with *Rhizobium* strains. 2. Changes in sterols, triterpenes, fatty acids, and volatile compounds. *J Agric Food Chem* 62:565-73. doi: 10.1021/jf4046655.
- Silva LR, Pereira MJ, Azevedo J, Mulas R, Velázquez E, González-Andrés F, Valentão P, Andrade PB.** (2013). Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* enhances the organic and fatty acids content of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) seeds. *Food Chem.* 141: 3636-48. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.045.
- Valverde A, Velázquez E, Cervantes E, Igual JM, van Berkum P.** (2011). Evidence of an American origin for symbiosis-related genes in *Rhizobium lusitanum*. *Appl Environ Microbiol* 77: 5665-70. doi: 10.1128/AEM.02017-10.
- Velázquez E, Palomo JL, Rivas R, Guerra H, Peix A, Trujillo ME, García-Benavides P, Mateos PF, Wabiko H, Martínez-Molina E.** (2010). Analysis of core genes supports the reclassification of strains *Agrobacterium radiobacter* K84 and *Agrobacterium tumefaciens* AKE10 into the species *Rhizobium rhizogenes*. *Syst Appl Microbiol* 33: 247-51. doi: 10.1016/j.syapm.2010.04.004.
- Velázquez E, Valverde A, Rivas R, Gomis V, Peix A, Gantois I, Igual JM, León-Barrios M, Willems A, Mateos PF, Martínez-Molina E.** (2010). Strains nodulating *Lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineages within *Bradyrhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 97: 363-76. doi: 10.1007/s10482-010-9415-7.