

ULL

Universidad
de La Laguna



Facultad de Ciencias
Sección BIOLOGÍA

**Departamento de Bioquímica,
Microbiología, Biología Celular y Genética**

Trabajo de Fin de Grado

Caracterización de bacterias simbióticas con leguminosas mediante el polimorfismo de restricción del gen ARN ribosómico 16S.

Characterization of legume symbiotic bacteria using 16S rRNA gene restriction fragment length polymorphism.

Grado en Biología

Sara Díaz Díaz

Julio, 2016

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2015/2016	ENTRADA Fecha: Núm:
--	----------------------------------

Datos Personales




Nº DNI o pasaporte:	Nombre y Apellidos:
78641937S	Sara Díaz Díaz
Teléfono:	Dirección de correo electrónico:
666227209	saradiazdiaz.94@hotmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

Caracterización de bacterias simbióticas con leguminosas mediante el polimorfismo de restricción del gen ARN ribosómico 16S.

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Milagros León Barrios		
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología celular y Genética.		
y D./Dña. Ángel M. Gutiérrez Navarro		
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología celular y Genética.		
Codirector Juan Pérez Yépez		
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado		
 Fdo.:	 Fdo.:	 Fdo.:

La Laguna, a 4 de Julio de 2016

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLOGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

Ejemplar para la Secretaría

ÍNDICE

Introducción	1
1.- Leguminosas, familia que surgió hace 60 millones de años.....	1
2.- La fijación biológica del nitrógeno.....	1
3.- Evolución de la taxonomía.	2
4.- Diversidad y taxonomía de los rizobios que nodulan a <i>Lotus</i> sp.....	4
5.- Métodos aplicables para el estudio de la biodiversidad microbiana en suelos.....	6
Objetivos	6
Material y métodos.....	7
1.- Localidades de muestreo y aislamiento de las cepas de rizobios.	7
2.- Mantenimiento de las cepas de rizobios.....	7
3.- Extracción del ADN mediante hervido.	8
4.- Extracción del ADN genómico (Para bacterias Gram negativas).	8
5.- Amplificación del gen ADNr 16S mediante PCR.....	9
6.- Electroforesis y cuantificación de ADN genómico.....	9
7.- Polimorfismo basado en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	10
8.- Electroforesis y análisis de los resultados del RFLP.....	10
9.- Análisis de las secuencias de ADNr 16S.....	10
10.- Test de nodulación.....	10
Resultados y discusión	11
1.- Descripción de las cepas aisladas de <i>Lotus campylocladus</i> y <i>Lotus hillebrandii</i>	11
2.- Análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción del ARNr 16S (16S-RFLP)	12
3.- Test de nodulación en <i>L. campylocladus</i> y <i>L. hillebrandii</i>	19
Conclusiones	22
Conclusions	23
Bibliografía.....	24

RESUMEN

En este trabajo se han caracterizado mediante 16S-RFLP 68 bacterias aisladas de los nódulos radicales de dos subespecies de *Lotus*, *Lotus campylocladus* ssp. *campylocladus* de Tenerife y *Lotus campylocladus* ssp. *hillebrandii* de La Palma. Los resultados mostraron una gran variabilidad genética entre estos microsimbiontes al encontrarse bacterias que pertenecen al menos a cinco géneros. Ahora bien, los principales microsimbiontes, con el 75 por ciento de los aislados, son miembros del género *Mesorhizobium* que se distribuyen en siete especies pertenecientes o próximas a *M. caraganae*, *M. ciceri*, *M. amorphae*, *M. gobiense*, *M. opportunistum*, *M. alhagi* y una especie no identificada. *M. amorphae* y *M. alhagi* son exclusivas de La Palma y Tenerife, respectivamente, y las restantes especies de mesorizobios se distribuyeron entre varias localidades de las dos islas. Los aislados del género *Rhizobium* fueron muy minoritarios y se agruparon con *R. lusitanum* y *R. leguminosarum*. El primero es exclusivo de Tenerife y el otro se encontró en ambas islas. Los test de reinfección efectuados con aislados representativos de los grupos 16S-RFLP demostraron que todas las especies de *Mesorhizobium* son verdaderos simbiontes de estos *Lotus*, destacando por sus características simbióticas el aislado LHILP13 del grupo *M. gobiense*.

Palabras clave: biogeografía, diversidad, *Lotus campylocladus*, *Lotus hillebrandii*, rizobios.

ABSTRACT

This study has characterized 68 isolates of root nodules of two *Lotus* subspecies, *Lotus campylocladus* ssp. *campylocladus* from Tenerife and *Lotus campylocladus* ssp. *hillebrandii* from La Palma, by 16S-RFLP. The results showed great genetic variability among these root nodule bacteria as it was found that they belong to at least five genera, wide. Nevertheless, the main microsymbionts with 75 per cent of the isolates are members of the *Mesorhizobium* genus, which are distributed among seven species belonging to or related to *M. caraganae*, *M. ciceri*, *M. amorphae*, *M. gobiense*, *M. opportunistum*, *M. alhagi* and a non-identified species. *M. amorphae* and *M. alhagi* are exclusively from La Palma and Tenerife respectively, and the rest are distributed between some locations on both islands. The isolates from *Rhizobium* genus were a minority which grouped into *R. lusitanum* and *R. leguminosarum*. The first is exclusive to Tenerife and the second to both islands. The reinfection test done with representative isolates of 16S-RFLP groups show that all *Mesorhizobium* species are true symbionts of these *Lotus*. The LHILP13 isolate from the *M. gobiense* group was noted for its symbiotic characteristics.

Keywords: biogeography, diversity, *Lotus campylocladus*, *Lotus hillebrandii*, rhizobia.

INTRODUCCIÓN

El archipiélago canario, situado a 13°-18°W y 27°-29°N, incluye 7 islas que de este a oeste son (Lanzarote, Fuerteventura, Gran Canaria, Tenerife, La Gomera, La Palma y El Hierro) que se extienden en una franja de unos 500 km. Lanzarote es la más cercana a la costa oeste de África (unos 100 km). Las islas son de origen volcánico, con una edad aproximada entre 21 millones a 0.8 millones de años (Carracedo, 1994). Son en gran parte abruptas y se han formado a través de múltiples erupciones a lo largo de la historia. La abrupta orografía combinada con la diferente exposición de sus laderas y la acción regular de los vientos alisios, ha generado diferentes zonas climáticas que albergan característicos pisos de vegetación que en una secuencia en la isla más alta (Tenerife) van desde el matorral de euforbias árido y semiárido costero, los bosques termo-esclerófilos semiáridos, la laurisilva seco-húmeda asociada a las áreas de nubes de las vertientes a barlovento de los alisios húmedos, el pinar de características seco-subhúmedas, el matorral de leguminosas de cumbre mayoritariamente seco-subhúmedo y por último la vegetación de violetas del pico Teide. En cuanto a la flora, destaca el alto porcentaje de endemidad, con dominancia de endemismos de una sola isla. Entre ellos se encuentran *Lotus campylocladus* ssp. *hillebrandii* Webb & Berthel, endemismo de La Palma y *Lotus campylocladus* ssp. *campylocladus* Webb & Berthel. (Christ) Sandral & D.D.Sokoloff, endemismo de Tenerife, objeto de nuestro estudio.

1.- Leguminosas, familia que surgió hace 60 millones de años.

Las leguminosas, pertenecientes a la familia *Fabaceae*, comprenden alrededor de unas 19000 especies y se cree que surgieron hace 60 millones de años (Schrire et al., 2005a). Son muy diversas en cuanto a morfología, hábitat y ecología. Una parte importante de las plantas que pertenecen a esta familia son utilizadas en la agricultura para obtener alimentos y un tercio de los requerimientos nutricionales en nitrógeno proceden de ellas; por otra parte, son responsables de una parte substancial del flujo de nitrógeno, desde el nitrógeno atmosférico hasta los compuestos fijados como el amonio, el nitrato y el nitrógeno orgánico (Rivas et al, 2009). De esta familia forma parte el género *Lotus*, en el cual nos centraremos en este trabajo.

2.- La fijación biológica del nitrógeno.

El nitrógeno es un elemento químico esencial para los seres vivos debido a su presencia en las principales macromoléculas (proteínas, ácidos nucleicos). A pesar de la amplia disponibilidad de nitrógeno en la atmósfera (un 78% del aire es nitrógeno), éste se encuentra como

dinitrógeno (N₂), forma no asimilable por la mayor parte de seres vivos, de manera que los suelos suelen soportar un déficit de nitrógeno combinado, lo que lo convierte en uno de los principales factores limitantes para el desarrollo de los vegetales.

La Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) es el proceso mediante el cual un conjunto de seres vivos, todos ellos procarióticos, son capaces de reducir el dinitrógeno atmosférico hasta amonio mediante el complejo enzimático de la nitrogenasa.

La capacidad de los microorganismos para fijar nitrógeno les permite liberarse de la dependencia de determinadas moléculas nitrogenadas como el nitrato, lo que les confiere una ventaja ecológica significativa, pues en los ecosistemas existe una gran demanda de nitrógeno fijado. Sin embargo, sólo determinados procariotas son capaces de llevarlo a cabo, algunos son de vida libre y no requieren de un hospedador para llevarlo a cabo, pero otros sí, por lo que se asocian con determinadas plantas, estableciendo una simbiosis, calculándose que, aproximadamente, un 65% del total del nitrógeno fijado en nuestro planeta procede de la fijación simbiótica entre las leguminosas y los rizobios (Lloret y Martínez-Romero, 2005).

Las relaciones simbióticas establecidas entre las leguminosas y los rizobios fijadores de nitrógeno han sido estudiadas desde hace un siglo como un clásico ejemplo de mutualismo. El término “rizobio” se utiliza actualmente para referirse al conjunto total de bacterias que son capaces de nodular y fijar nitrógeno en asociación con leguminosas y que hoy incluye no sólo al género *Rhizobium* sino también a otros cinco géneros que han surgido de especies inicialmente clasificadas como *Rhizobium* (*Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Allorhizobium* y *Azorhizobium*), además de otros nuevos géneros con distintas relaciones filogenéticas.

3.- Evolución de la taxonomía.

Al final del siglo XIX, se empezó a intuir que el nitrógeno atmosférico era asimilado a través de los nódulos de las raíces de las leguminosas y que éstos eran la consecuencia de la infección de la raíz por una bacteria del suelo. El primer aislado fue denominado *Bacillus radicícola* (Beijerinck, 1888), cuyo nombre posteriormente fue cambiado a *Rhizobium leguminosarum* (Frank, 1889).

A principios de 1960, se comenzó a utilizar una gran variedad de características en los estudios taxonómicos, entre ellas, características morfológicas, nutricionales y metabólicas (Graham, 1964; Moffet y Colwell, 1968; ‘tMannetje, 1967), serológicas (Graham, 1963;

Vincent y Humphrey, 1970) y de comparación del ADN (De Ley y Rassel, 1965), con lo que se demostró el parentesco entre los géneros *Rhizobium* y *Agrobacterium* y la existencia de rizobios de crecimiento rápido y los de crecimiento lento.

Desde los años 80, se ha encontrado una mayor diversidad entre los rizobios debido al uso de características genéticas, gracias a métodos como la hibridación ADN-ADN o ADN-ARN o secuenciación del ADNr, así como el estudio de una mayor diversidad de especies de leguminosas.

Actualmente son ampliamente aceptados cinco géneros: *Rhizobium* (Frank, 1889), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997) y *Allorhizobium* (De Lajudie et al., 1998), y recientemente se han propuesto dos más, *Neorhizobium* y *Pararhizobium* (Lindström, 2015). Otros se han encontrado de forma esporádica como *Shinella*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Devosia* (α -proteobacteria) o *Burkholderia* (β -proteobacteria).

El género *Rhizobium*, por su parte, presenta actualmente alrededor de 50 especies. Recientes estudios parecen mostrar que los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Agrobacterium* se encuentran muy relacionados entre sí y se ha propuesto que se abandonen los géneros *Allorhizobium* y *Agrobacterium*, incorporándolos al género *Rhizobium* (Young et al., 2001); sin embargo, esta propuesta no ha sido aceptada por toda la comunidad científica (Farrand et al., 2003).

El género *Sinorhizobium* fue propuesto por Chen et al. (1988) como un género separado de los rizobios de crecimiento rápido, renombró a *Rhizobium fredii* como *Sinorhizobium fredii*, lo cual supuso en un primer momento un tema de controversia, pues no se aportó evidencia genética que justificara esta creación. Posteriormente, Lajudie et al. (1994), presentaron datos filogenéticos, que avalaban esta propuesta. Actualmente, se han descrito unas 15 especies.

Respecto al género *Mesorhizobium* fue propuesto para incluir en él cinco especies, que son *Rhizobium loti*, *R. huakuii*, *R. ciceri*, *R. mediterraneum* y *R. tianshanense*, que se encuentran filogenéticamente relacionadas pero lejanas a el grupo filogenético que incluye a *Rhizobium*, *Agrobacterium* y *Sinorhizobium* (Jarvis et al., 1997). Se caracterizan por presentar un crecimiento intermedio entre los rizobios de crecimiento rápido y lento. Hoy en día el género *Mesorhizobium* incluye más de 30 especies.

Por su parte el género *Bradyrhizobium* fue propuesto para la especie de crecimiento lento *Rhizobium japonicum* (Jordan, 1982). Al principio *Bradyrhizobium japonicum* fue la única especie descrita, sin embargo se reconocía la existencia de otras cepas de crecimiento lento (Elkan y Bunn, 1992). Posteriormente, se añadieron cinco especies adicionales, que son *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992), *B. liaoningense* (Xu et al., 1995), *B. yuanmingense* (Yao et al., 2002), *B. betae* (Rivas et al., 2004) y *B. canariense* (Vinuesa et al., 2005). Y en la actualidad existen más de una docena de especies.

4.- Diversidad y taxonomía de los rizobios que nodulan a *Lotus* sp.

Lotus es un género grande y cosmopolita, constituido por unas 150 especies que ocupan la región mediterránea (que incluye partes de Europa, África y el oeste de Asia) y el oeste de Norteamérica (Barrientos et al., 2002, Sokoloff y Lock, 2005). Recientemente ha aumentado el interés en ubicar a este género y sus especies usando datos morfológicos y moleculares pero, sin embargo, estos estudios necesitan una base taxonómica profunda y se concluye que *Lotus* es un género taxonómicamente difícil (Gillett, 1958; Heyn y Herrnstadt, 1968; Kramina, 1999a,b, 2006; Kramina y Sokoloff, 2004).

En las Islas Canarias se han identificado tres grupos de especies dentro de la sección *Pedrosia* denominadas grupo de *Lotus sessilifolius*, grupo de *Lotus emeroides* y grupo de *Lotus campylocladus*. Este último incluye *L. spartioides* de Gran Canaria, *L. campylocladus* Webb & Berthel de Tenerife y *L. hillebrandii* Christ de La Palma. Estos tres son típicos de regiones de montaña y a menudo crecen en pinar (Bramwell y Bramwell 1974).

La filogenia del género ha sido estudiada mediante análisis cladísticos basados en datos morfológicos (Arambarri, 2000) y moleculares (Allan et al. 2003, 2004; Degtjareva et al. 2006), lo que ha llevado a importantes cambios taxonómicos. En lo que concierne a nuestro trabajo, hay que decir que la especie *L. hillebrandii* de la Palma es considerada actualmente una subespecie de *L. campylocladus*, *L. campylocladus* ssp. *hillebrandii*, y el de Tenerife pasaría a *L. campylocladus* ssp. *campylocladus*. Sin embargo, para facilitar la lectura de esta memoria, continuaremos llamando *Lotus campylocladus* a la subespecie presente en Tenerife y *L. hillebrandii* a la de La Palma.

La simbiosis entre *Lotus* y sus rizobios fue considerada altamente específica y sólo se reconocían dos grupos de bacterias divergentes como microsimbiontes de *Lotus* sp.: *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*). Las cepas de crecimiento rápido fueron

clasificadas inicialmente como *Rhizobium loti*, y posteriormente reclasificada en el género *Mesorhizobium* como *M. loti*. Esta ha sido considerada el microsimbionte típico que nodula las especies del complejo *Lotus corniculatus* (*L. corniculatus* L., *L. tenuis* Schkuhr y la planta modelo *L. japonicus* L.) (Fulchieri et al., 2001; Jarvis et al., 1982; Saeki y Kouchi, 2000; Sullivan et al., 1996). Por otro lado, las cepas de crecimiento lento no se han clasificado hasta recientemente a nivel de especies y se han denominado *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) y son los típicos simbioses de *L. uliginosus* Schkuhr, *L. subbiflorus* Lagasca o *L. angustissimus* L.

El aumento del número de especies de *Lotus* estudiadas y la descripción adicional de géneros y especies bacterianas como simbioses naturales de *Lotus* spp. ha abierto un escenario más complejo que el clásico donde sólo existían los dos grupos simbioses compatibles de *Lotus* anteriormente mencionados. Así, los actuales datos presentan un esquema taxonómico mucho más complejo de los rizobios que nodulan los *Lotus*, encontrándose numerosas especies distribuidas en cinco géneros: *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Aminobacter*. El género *Rhizobium*, aunque se aísla con cierta frecuencia de nódulos de *Lotus*, no ha sido confirmado en la mayoría de los casos como verdadero simbiote de *Lotus* (Han et al., 2008; Estrella et al., 2009; Lorite et al., 2010; Zakhia et al., 2004). Son excepciones, *R. multihospitum* (Han et al., 2008) una especie de amplio rango de hospedadores y un aislado de *R. leguminosarum*, que si han sido confirmados como verdaderos simbioses de *Lotus* (Gossmann et al., 2012).

El género *Sinorhizobium* ha sido aislado esporádicamente de *Lotus* pero podría ser un microsimbionte predominante en zonas áridas (León-Barrios, 2009; Lorite et al., 2010; Merabet et al., 2010; Rejili et al., 2009; Rejili et al., 2012; Zakhia et al., 2004). Más recientemente (León-Barrios et al., 2009), se ha descrito que cepas de *Sinorhizobium meliloti* son simbioses compatibles con algunas especies de *Lotus* endémicas de las Islas Canarias, como *L. lacerottensis* Weeb y Berthel, *L. sessilifloius* DC. y *L. maculatus* Breif.

Ahora bien, son diversas especies del género *Mesorhizobium* los microsimbioses más importantes de los *Lotus*, tanto de silvestres como cultivados. Las principales especies aisladas de nódulos radicales de *Lotus* pertenecen o son muy próximas a: *M. amorphae*, *M. mediterraneum*, *M. tianshanense*, *M. chacoense*, *M. albiziae*, *M. alhagi*, *M. ciceri*, *M. plurifarium* y *M. caraganae*. Respecto al género *Bradyrhizobium*, están relacionadas sobre todo con *B. japonicum* y algunas con *B. yuanmingense*.

5.- Métodos aplicables para el estudio de la biodiversidad microbiana en suelos.

El conocimiento sobre la biodiversidad microbiana se ha ido incrementando desde los inicios de la Microbiología de manera paralela al desarrollo de nuevas técnicas aplicadas a los análisis de diversidad y a la taxonomía. Desde las técnicas iniciales basadas exclusivamente en características fenotípicas, pasando por las técnicas genéticas de hibridación de ADN-ADN genómicos, hasta las actuales basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación de ácidos nucleicos, el número de nuevos microorganismos descritos ha aumentado de manera casi exponencial. En las últimas décadas, se ha acuñado el término “Taxonomía polifásica” para denominar a un proceso integrador, basado en el mayor número posible de técnicas y atributos diferentes, fenotípicos, genéticos y filogenéticos, para describir nuevas especies.

En este punto, nos parece necesario señalar que en los estudios de biodiversidad se ha de elegir primero la/s técnica/s más apropiadas según el objetivo perseguido, ya que no todas discriminan al mismo nivel taxonómico.

Un tipo de técnicas genotípicas muy utilizadas en estudios de diversidad y taxonomía son los perfiles RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”) obtenidos por restricción de genes previamente amplificados por PCR, generalmente del gen que codifica para el ARN ribosómico 16S (16S-RFLP). La restricción del gen ARN ribosómico 16S, con un mínimo de tres o cuatro enzimas, es una técnica que ofrece una buena delimitación a nivel de género, y aproximarse a las especies más cercanas. Ahora bien, es necesario tener en cuenta que por su alto grado de conservación presenta limitaciones para diferenciar especies próximas, lo que implica en ocasiones que un mismo perfil de RFLP puede corresponder a especies diferentes.

OBJETIVOS

Dentro del grupo de investigación “Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismo” se ha aislado una colección de bacterias a partir de nódulos radicales de una especie de leguminosas endémica de las Islas Canarias, *Lotus campylocladus* ssp. *hillebrandii* de La Palma y *Lotus campylocladus* ssp. *campylocladus* de Tenerife. El objetivo general del presente trabajo es la caracterización de esta colección de rizobios. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización genética de las poblaciones de rizobios que nodulan *L. campylocladus* en Tenerife y La Palma mediante polimorfismo de restricción (16S-RFLP).
2. Análisis comparativo de la diversidad de genotipos en las distintas localidades de muestreo.
3. Ensayos de infectividad de genotipos representativos para comprobar la eficacia de nodulación y fijación.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Localidades de muestreo y aislamiento de las cepas de rizobios.

Las cepas de rizobios utilizadas en este trabajo pertenecen a la colección de bacterias del grupo “Interacciones Beneficiosas Planta-Microorganismo” del área de Microbiología del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética. Estas bacterias habían sido previamente aisladas a partir de nódulos radicales de *L. hillebrandii* y de *L. campylocladus* recolectadas en las islas de La Palma y Tenerife, respectivamente. Las distintas cepas aisladas y su localización están recogidas dentro del apartado de Resultados, en la Tabla 6.

2.- Mantenimiento de las cepas de rizobios.

El cultivo de los rizobios se realizó sembrando las cepas en el medio YM (Yeast extract-Manitol, Vincent, 1970), líquido o solidificado con agar (15 g/l), cuya composición es la siguiente:

Tabla 1. Composición del medio YM

Componentes	Cantidad (g/l)
K ₂ HPO ₄	0,5
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
Extracto de levadura	0,8
Manitol	10
pH	6,6-6,8

Las cepas de la colección, mantenidas a -80°C , se “refrescaron” creciéndolas en placas con medio YMA y se incubaron entre 5-7 días hasta que se desarrollaron las colonias. Las colonias se suspendieron en solución salina para obtener ADN genómico, bien por el método del hervido o alternativamente utilizando el kit Aqua Pure Genomic DNA isolation, explicado a continuación.

3.- Extracción del ADN mediante hervido.

Se prepararon suspensiones bacterianas en tubos Eppendorf resuspendiendo las colonias en 500 μl de solución salina (0,9 % de NaCl), hasta una turbidez 3 en la escala de McFarland. Los tubos así preparados se sumergieron durante 10 minutos en agua hirviendo, para provocar la rotura de la célula y la liberación del ADN. A continuación, se centrifugó 5 minutos a 13000 rpm y se recuperó el ADN del sobrenadante. Como ADN molde para la reacción de amplificación, se usaron alícuotas de 5-10 μl de este sobrenadante.

4.- Extracción del ADN genómico (Para bacterias Gram negativas).

Cuando los resultados de extracción dieron negativo con el método del hervido, la extracción de ADN se realizó usando el kit AquaPure Genomic DNA Isolation (BioRad). Para ello, las cepas fueron cultivadas en 5 ml de medio YM hasta el final de la fase exponencial y 1,5 ml de los cultivos se centrifugaron a 15000 rpm 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y al sedimento se le añadió 300 μl de la solución de lisis de DNA genómico y se incubó a 80°C durante 5 minutos. Posteriormente, se añadió 1,5 ml de la solución con RNasa A, se agitó suavemente (invirtiendo el tubo unas 25 veces) y se incubó a 37°C durante 45 minutos. Las proteínas se precipitaron añadiendo 80 μl de la solución de precipitación de proteínas y se centrifugó 3 minutos a 13000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf y el sedimento fue desechado.

El ADN del sobrenadante se precipitó añadiendo 300 μl de isopropanol, invirtiendo suavemente el tubo unas 50 veces y centrifugando a 13000 rpm 1 minuto. El ADN precipitado se lavó añadiendo 300 μl de etanol al 70% y centrifugando 1 minuto a 13000 rpm. A continuación, se descartó el sobrenadante y el ADN en el sedimento se dejó secar al aire. Por último, se hidrató el ADN añadiendo (según la cantidad de sedimento obtenida) entre 50 y 100 μl de solución de hidratación del ADN. Se incubó a 65°C durante 5 minutos, se agitó en vortex 5 segundos. El ADN genómico así extraído se conservó a 4°C hasta su posterior utilización.

5.- Amplificación del gen ADNr 16S mediante PCR.

La amplificación de este gen se hizo mediante PCR, con la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 2. Mezcla de reacción de PCR

Componentes	Cantidad
Premix Takara	15 μ l
fD1	1 μ l
rD1	1 μ l
Agua destilada	12 μ l
ADN molde	1 μ l (5 μ l ADN obtenido de hervido)
Volumen final = 30 μ l	

Se utilizó la pareja de cebadores universales fD1/rD1 (Weisburg et al., 1991), cuyas secuencias son las siguientes:

Cebador	Secuencia
fD1	5'-AGAGTTTGATCCTCCTGGCTCTCAG-3'
rD1	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

Se utilizó el termociclador iCycler™ de BioRad, con los siguientes parámetros del ciclo:

Tabla 3. Parámetros de ciclado para PCR

Ciclo	Paso	Temperatura	Tiempo
Ciclo 1 (1x)	Paso 1	95°C	3 min. 30 seg.
Ciclo 2 (30x)	Paso 1	94°C	1 min. 10 seg.
	Paso 2	56°C	40 seg.
	Paso 3	72°C	2 min. 10 seg.
Ciclo 3 (1x)	Paso 1	72°C	6 min. 20 seg.
Ciclo 4 (1x)	Paso 1	18°C	∞

6.- Electroforesis y cuantificación de ADN genómico.

El tamaño del producto amplificado (unos 1600pb para el ADNr 16S) se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1 % (0,5 g de agarosa en 50 ml de TAE 1X) y para el revelado se añadió al gel 0,7 μ l de Midori Green. El gel se cargó con 12 μ l de la siguiente mezcla: H₂O (6 μ l); tampón de carga (2 μ l); ADN (4 μ l). Uno de los pocillos se cargó con 2 μ l del marcador de peso molecular de 100 pb (TaKaRa).

La captura de la imagen del gel se realizó con el equipo ImageMaster® VDS asociado al software LISCAP Capture Application.

7.- Polimorfismo basado en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Alícuotas de los productos amplificados de 1600pb se sometieron a restricción, de manera independiente, con tres endonucleasas que previamente han sido mostradas de utilidad en la taxonomía de los rizobios. En este trabajo se utilizaron tres HinfI (secuencia diana, G▼ANTC), MspI (secuencia diana, C▼CGG) y RsaI (secuencia diana, GT▼AC).

Para los ensayos de restricción se usó la siguiente mezcla de reacción:

Tabla 4. Mezcla de reacción utilizada para los ensayos de restricción del ADN_r 16S

Tampón (HinfI/MspI/RsaI)	2 µl
Enzima (HinfI/MspI/RsaI)	0,5 µl
BSA	0,2 µl
Agua destilada	9,3 µl
ADN amplificado	8 µl
Volumen final = 20 µl	

La mezcla de restricción se incubó a 37°C durante tres horas y se conservó en la nevera hasta su posterior resolución en geles de agarosa.

8.- Electroforesis y análisis de los resultados del RFLP.

Los fragmentos de la reacción de restricción se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa de alta resolución al 1,5 % o, alternativamente, agarosa de muy alta resolución al 3,5 %. El ADN se visualizó añadiendo al gel 2 µl de Midori Green. La mezcla de carga (25 µl) fue la siguiente: Tampón de carga, 5 µl; ADN, 20 µl.

9.- Análisis de las secuencias de ADN_r 16S.

Las imágenes digitalizadas de los geles (en archivos TIFF) se analizaron utilizando el programa GelComparII v. 4.0, que permite comparar los patrones de polimorfismo y elaborar matrices de similitud que se pueden representar en forma de dendograma.

10.- Test de nodulación.

Se realizó un test de infectividad para comprobar si las cepas de rizobios aisladas eran capaces de reinfectar (nodular y fijar nitrógeno) los hospedadores originales, teniendo en cuenta los ribotipos y los lugares de recolección.

Las semillas se escarificaron frotándolas ligeramente con papel de lija y se esterilizaron siguiendo el protocolo que se describe a continuación: se pasaron 30 segundos por alcohol y luego se sumergieron de 5-7 minutos en lejía comercial diluida al 50 %. Los restos de lejía se eliminaron mediante seis lavados con agua estéril. Finalmente, se colocaron las semillas en placas de Petri con agar-agua 1% para su germinación.

Las placas fueron selladas con parafilm y mantenidas en oscuridad varios días hasta que se produjo su germinación. Una vez germinadas, se colocaron entre 6 y 7 semillas en placas cuadradas de 12 cm de lado y 1 cm de profundidad que contenían el medio de Rigaud & Puppo de la siguiente composición:

Tabla 5. Composición del medio de Rigaud y Puppo

Componentes	Cantidad (g/l)
MgSO ₄ •7H ₂ O	0,15
KH ₂ PO ₄	0,15
KCl	0,15
CaCl ₂	0,05
Elementos traza*	1 ml/l
Secuestrina	0,025
Agarosa media resolución	4
pH	6,6-6,8
*La solución de elementos traza tenía la siguiente composición (g/l): H ₃ BO ₃ , 2,86; MnSO ₄ .4H ₂ O, 2,03; ZnSO ₄ .7H ₂ O, 0,22; CuSO ₄ .5H ₂ O, 0,08; Na ₂ MoO ₄ , 0,14.	

Para la inoculación, se colocaron 500 µl de solución salina en cada tubo eppendorf a usar, se resuspendieron en ellos las cepas seleccionadas y con esa suspensión se inocularon las plántulas. Posteriormente, las placas se sellaron y se colocó papel de aluminio en la mitad inferior de la placa, cubriendo las semillas, para mantener las condiciones de oscuridad. Finalmente, se colocaron en una cámara de cultivos con 16 horas de luz y 8 de oscuridad y aproximadamente 25°C durante el día y 20°C durante la noche.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Descripción de las cepas aisladas de *Lotus campylocladus* y *Lotus hillebrandii*.

La mayoría de las cepas aisladas de *L. campylocladus*, tras 5-7 días de incubación en el medio YMA, produjeron colonias de 0,5 a 2 mm de diámetro, poco mucosas, mientras que las cepas LCA3, LCA5, LCA6 y LCA9 formaron colonias más mucosas que llegaron a ser de 4 a

7 mm. Ambos grupos de colonias son compatibles con el aspecto que presentan las de los rizobios. Sin embargo, las colonias de LCA4, LCA7, LCA27 y LCA28, tenían aspecto muy diferente a las de rizobios, y podrían ser endófitos presentes en los nódulos que, por lo común pertenecen a géneros diversos de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas.

Las cepas aisladas de *L. hillebrandii*, tras 5-7 días de incubación en el medio YMA produjeron colonias de 0,5 a 2 mm de diámetro, poco mucosas, y las cepas de LHILP20 , LHILP22, LHILP29, LHILP30 y LHILP40 de unos 4 mm, ambas compatibles con las colonias que presentan los rizobios en este medio. Las colonias LHILP16B, LHILP18B, LHILP19B, LHILP23B y LHILP38, sin embargo, no tenían el aspecto de los rizobios.

2.- Análisis de polimorfismos de fragmentos de restricción del ARNr 16S (16S-RFLP)

La amplificación del gen ARNr 16S con la pareja de cebadores universales fD1/rD1 dio en todos los casos un fragmento único de aproximadamente 1600pb. Para los aislados LHILP14, LHILP16B, LHILP18B, LHILP23B, LHILP28B y LHILP40, no resultó posible amplificar el gen.

Los productos obtenidos fueron digeridos individualmente con 3 endonucleasas diferentes, *HinfI*, *MspI* y *RsaI*, que dieron patrones de restricción polimórficos con 3-6 fragmentos, teniendo en cuenta que solo se consideraron los de un tamaño igual o superior a 100pb.

RsaI resolvió, para la mayor parte de los aislados, un perfil de tres bandas que no discriminó entre las diferentes especies del género *Mesorhizobium*, pero diferenció los géneros *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* de los otros géneros de referencia (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Agrobacterium* y *Phyllobacterium*).

MspI fue la más resolutiva para discriminar entre las especies de *Mesorhizobium*, produciendo perfiles de 5 a 6 bandas de peso molecular entre 500 y 100pb.

HinfI tuvo un poder de discriminación intermedio, produciendo perfiles de 3 a 4 bandas.

El análisis combinado de los perfiles de restricción obtenidos con las tres endonucleasas resolvió 32 patrones diferentes, que en varios casos fueron idénticos a los de las especies de referencia (Figura 1).

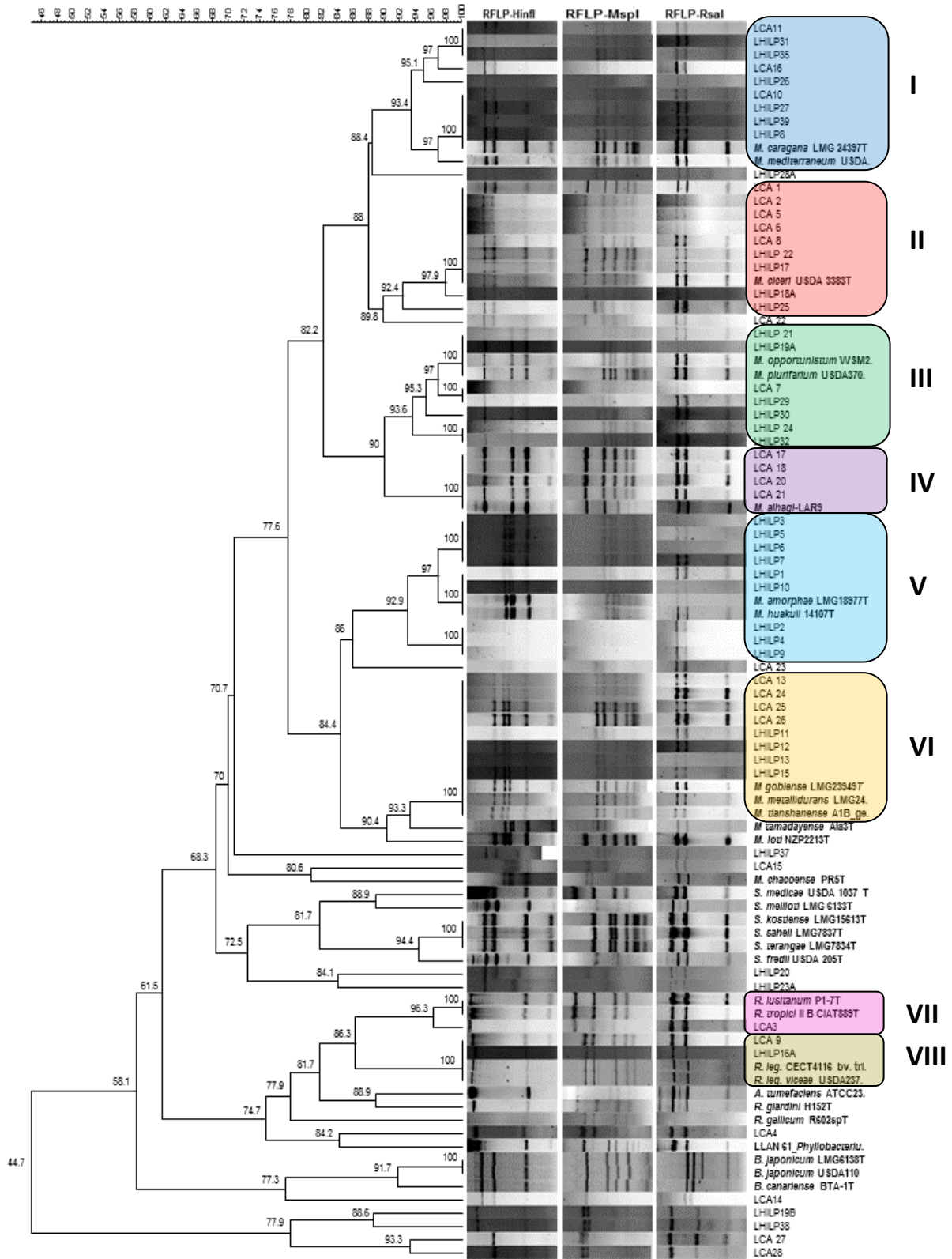


Figura 1. Árbol filogenético obtenido con el método de UPGMA del 16S-RFLP (Hinfi-MspI-RsaI), para los aislados de *L. campylocladus* y *L. hillebrandii* y las cepas de referencia.

La técnica sirvió para la clasificación de los aislados a nivel de género: 51 de los aislados se incluyeron en un gran cluster con las especies de referencia del género *Mesorhizobium* ($S_D \geq 77,6\%$), tres se incluyeron dentro del género *Rhizobium* ($S_D \geq 77,9\%$), dos (LHILP20, LHILP23A) forman parte de un linaje próximo a *Sinorhizobium* ($S_D \geq 72,5\%$), uno (LCA4) es próximo a *Phyllobacterium* ($S_D \geq 84,2\%$), otro (LCA14) está emparentado con *Bradyrhizobium* ($S_D \geq 77,3\%$) y cuatro (LCA27, LCA28, LHILP19B y LHILP38) formaron un grupo externo a todos los rizobios (Figura 2)

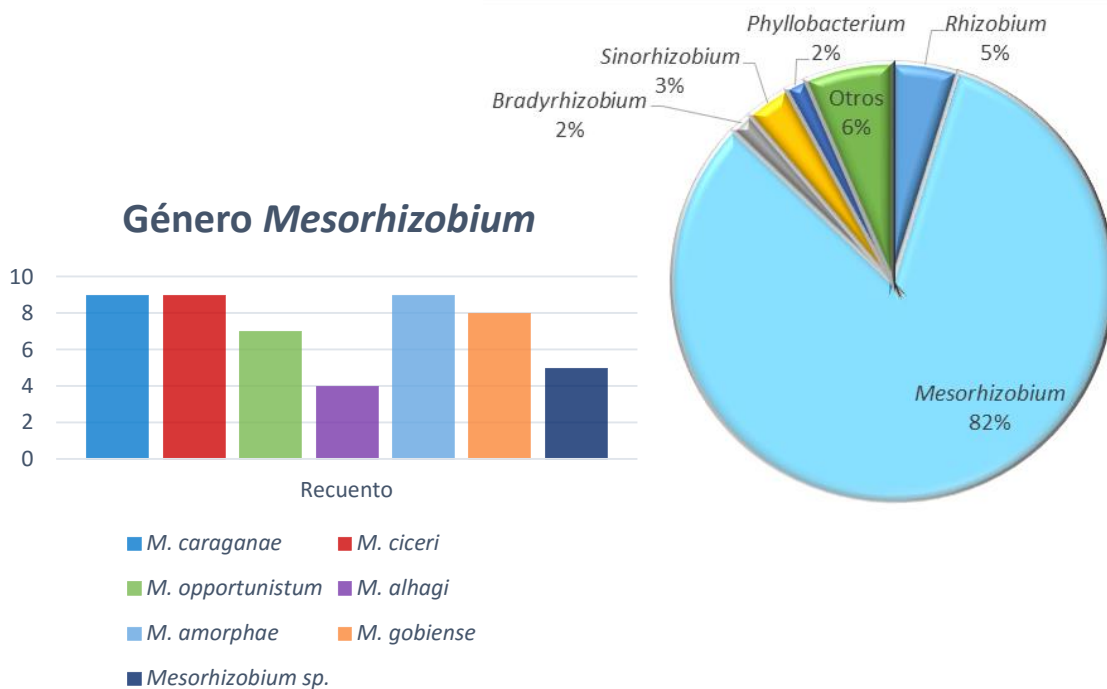


Figura 2. Porcentaje que representa cada género de rizobios aislados (Derecha) y recuento de aislados pertenecientes a los ribotipos I-VI y *Mesorhizobium* sp. (Izquierda) de *L. campylocladus* de las islas de Tenerife y La Palma.

Debido al alto grado de conservación del ARNr 16S, la técnica no permite discriminar entre especies próximas y, por ello, no existe un único criterio por el que se pueda delimitar las especies. En este trabajo se ha aceptado como límite un 90% de semejanza para delimitar 8 grandes grupos de RFLP que contienen una o varias especies próximas a los que denominamos ribotipos I a VIII. Seis de ellos se encuadraron dentro del género *Mesorhizobium*. (Figura 2).

El ribotipo I o grupo *M. caraganae*, representado por un perfil idéntico ($S_D=100\%$) que incluyó las cepas de referencia *M. caraganae* y *M. mediterraneum* y los aislados LCA10, LHILP8, LHILP27 y LHILP39 y un subgrupo con varios perfiles próximos ($S_D=93,4\%$) que incluían los aislados LCA11, LCA16, LHILP26, LHILP31 y LHILP35 (Figura 1), la mayoría de los cuales procedían de *L. hillebrandii*. En cuanto su distribución geográfica, cabe destacar su dispersión pues hay tres aislados (LCA10, LCA11 y LCA16) procedentes del municipio de La Guancha en Tenerife y los seis restantes procedentes de la isla de Las Palma, dos de ellos recolectados en Bejenado (LHILP26 y LHILP27) y uno (LHILP8) de Fuente de La Mula, ambas localizaciones de la Caldera de Taburiente, y tres (LHILP31, LHILP35 y LHILP39) del Barranco de Los Hombres, fuera de la Caldera.

El ribotipo II o grupo *M. ciceri* representado por un perfil idéntico ($S_D=100\%$) que incluyó la cepa de referencia, que da nombre al grupo, *M. ciceri*, y los aislados LCA1, LCA2, LCA5, LCA6, LCA8, LHILP17 y LHILP22; además de otros dos perfiles pertenecientes a LHILP18A ($S_D=97,9\%$) y LHILP25 ($S_D=92,4\%$). Teniendo en cuenta su distribución, no se observó demasiada variabilidad en cuanto a su localización dentro de cada isla siendo mayoritariamente de Tenerife, isla de la que procedían cinco aislados, cuatro de ellos (LCA2, LCA5, LCA6 y LCA8) del municipio de La Guancha y uno (LCA1) de Vilaflor. En La Palma se recolectaron tres (LHILP17, LHILP18A y LHILP22) en el Mirador Las Chozas y uno (LHILP25) en Bejenado.

El ribotipo III o grupo *M. opportunistum* presenta una cierta variabilidad genética puesto que de los siete aislados pertenecientes a él, dos (LHILP19A y LHILP21) tienen un perfil idéntico ($S_D=100\%$) a las cepas de referencia *M. opportunistum* y *M. plurifarium*; otros dos (LCA7 y LHILP29) presentan perfiles idénticos entre sí y una semejanza del 97% con el grupo anterior; por su parte, LHILP30 tiene una semejanza de 95,3% con los dos grupos anteriores y, por último, LHILP24 y LHILP32 tienen un perfil idéntico ($S_D=100\%$ entre ellos) y una semejanza de 93,6% con el resto de los integrantes del ribotipo. (Figura 1). Con la única excepción de LCA7 que procedía de La Guancha (Tenerife), todos proceden de La Palma, repartidos por igual en el Barranco de Los Hombres (LHILP29, LHILP30 y LHILP32) y en el Mirador Las Chozas (LHILP19A, LHILP21 y LHILP24). Estos resultados sugieren que dentro de este ribotipo nuestros aislados pertenecen a varias especies de *Mesorhizobium*.

El ribotipo IV o grupo *M. alhagi* representado por un perfil idéntico ($S_D=100\%$) que incluyó a la cepa de referencia, que da nombre al grupo, *M. alhagi* y los aislados LCA17, LCA18,

LCA20 y LCA21 (Figura 1), todos ellos recolectados en el municipio de Los Realejos en Tenerife.

El ribotipo V o grupo *M. amorphae* representado por tres perfiles idénticos ($S_D=100\%$), el primero incluyó las cepas de referencia *M. amorphae* y *M. huakuii* y los aislados LHILP1 y LHILP10; el segundo incluyó los aislados LHILP3, LHILP5, LHILP6 y LHILP7, con una semejanza del 97%, con el grupo anterior; y un tercero que incluyó LHILP2, LHILP4 y LHILP9, con una semejanza de 92,9% con el resto (Figura 1). En este caso resulta evidente que el ribotipo incluye, al menos, tres especies. Todos fueron recolectados en la Fuente de La Mula en La Palma.

El ribotipo VI o grupo *M. gobiense* representado por un perfil idéntico ($S_D=100\%$), que incluyó a las cepas de referencia *M. gobiense*, *M. metallidurans* y *M. tianshanense* y los aislados LHILP11, LHILP12, LHILP13, LHILP15, LCA13, LCA24, LCA25 y LCA26 (Figura 1). Fueron recolectados cuatro aislados en Tenerife, tres (LCA24, LCA25 y LCA26) de ellos en Vilaflor y uno (LCA13) en La Guancha. En La Palma fueron recolectados otros cuatro (LHILP11, LHILP12, LHILP13 y LHILP15), todos procedentes del Barranco de Briestas.

El ribotipo VII o grupo *R. lusitanum*, incluyó dos perfiles, el primero ($S_D=100\%$) con las cepas de referencia *R. lusitanum* y *R. tropici*, que se relacionaba en un 96,3% con un segundo perfil que incluyó al aislado LCA3 aislado en el municipio de La Guancha

Por último, el ribotipo VIII contenía un único perfil ($S_D=100\%$) que incluía dos cepas de referencia de *R. leguminosarum* y los aislados LCA9 y LHILP16A (Figura 1).

Con independencia de lo anterior, cinco de los aislados, aunque pertenecientes al género *Mesorhizobium*, presentaron perfiles que no se asociaban con especies de referencia, bien por representar especies nuevas, o bien por no haberse incluido en este trabajo la especie de referencia (a este grupo lo denominaremos *Mesorhizobium* sp.). Así, LHILP28A tiene un $S_D=88,4\%$ con el ribotipo I; LCA22 $S_D=89,8\%$ con el ribotipo II; LCA23 $S_D=86\%$ con el ribotipo V; LHILP37 $S_D=70,7\%$ con los ribotipos del I al VI y LCA15 relacionado con *M. chacoense* ($S_D=80,6$).

En resumen, los principales microsimbiontes de *L. campydocladus* y *L. hillebrandii* pertenecen al género *Mesorhizobium* (51 de los 68 aislados) y se distribuyen de manera entre siete especies siendo las mayoritarias *M. caraganae*, *M. ciceri*, *M. opportunistum*, *M.*

amorphae y *M. gobiense* con 8 ó 9 aislados cada una, seguidas por *M. alhagi* y *Mesorhizobium* sp. Ocasionalmente, estos *Lotus* podrían estar noduladas por algunas especies del género *Rhizobium*, de los aislados dos fueron próximos a *R. leguminosarum* y uno a *R. lusitanum*. Aunque esta última especie de *Rhizobium* no es un simbionte habitual de los *Lotus*, no es la primera vez que se aísla de los nódulos de estas leguminosas. Así fue descrito por Gossmann et al., (2012) como un verdadero simbionte de *Lotus corniculatus*.

En cuanto a su distribución geográfica, la Figura 3 muestra una comparación de la presencia de cada una de la especies en las dos islas consideradas en este trabajo. Todas las especies muestran homogeneidad en cuanto al número de aislados en ambas islas, salvo *M. caraganae* y *M. opportunistum* recolectados en la isla de La Palma que predominan sobre los de la isla de Tenerife. Por otro lado, se encontraron grupos que fueron exclusivos de cada isla, *M. amorphae* de La Palma y *M. alhagi* y *R. lusitanum* de Tenerife.

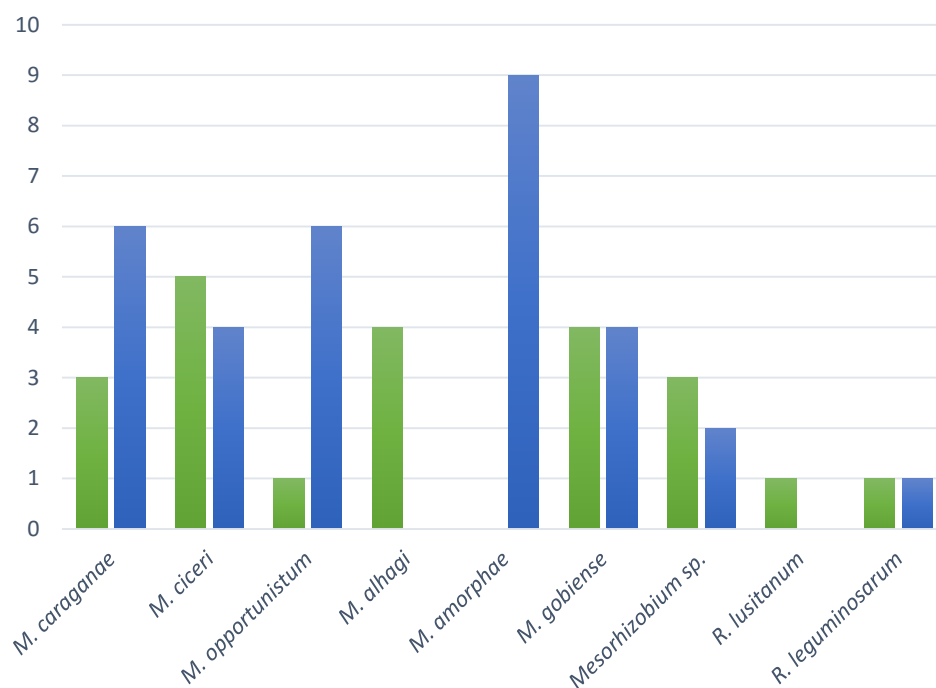


Figura 3. Número de aislados pertenecientes a cada ribotipo de los rizobios asociados a *Lotus* de las Islas de Tenerife (verde) y La Palma (azul).

Centrándonos en la diversidad por isla, en la Figura 4 se muestra la distribución de los diferentes grupos en los tres municipios de Tenerife. La Guancha es el que presenta una mayor diversidad, encontrándose aislados pertenecientes a todos los grupos, con excepción de *M. alhagi*. Destacan *M. caraganae* (3 aislados) y *M. ciceri* (4 aislados) sobre el resto. El

municipio de Vilaflor, por su parte, se encuentra representado por *M. ciceri* y *M. gobiense*, destacando este último con 3 aislados. Finalmente Los Realejos, que se encuentra representado por algunas especies del género *Mesorhizobium* y *M. alhagi*, que además de encontrarse sólo en Tenerife (Figura 3), no se encuentra en otro municipio.

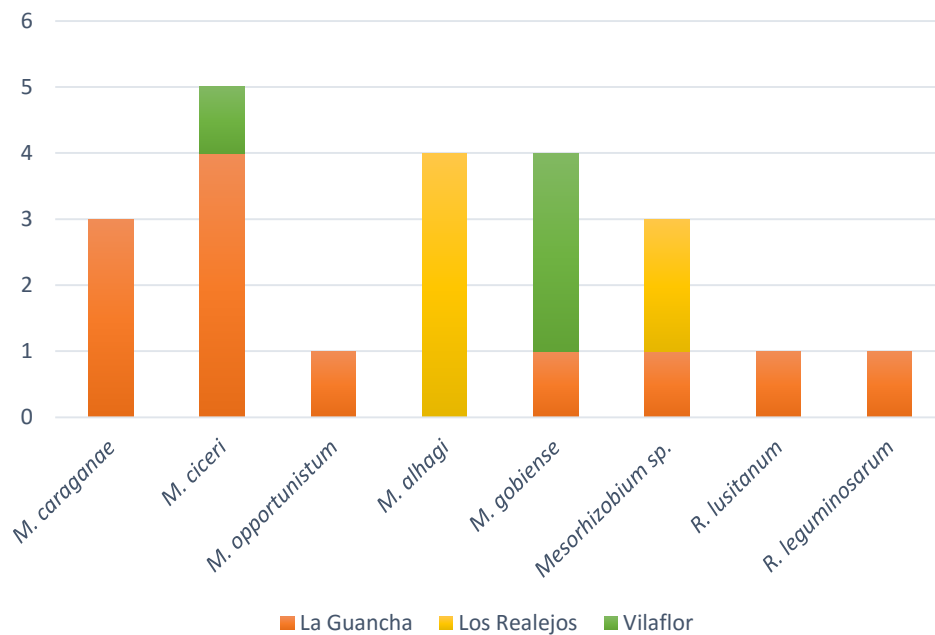


Figura 4. Distribución de los rizobios aislados de *L. campylocladus* en las distintas localidades de la isla de Tenerife.

La distribución en los cinco puntos de muestreo de La Palma se presenta en la Figura 5. Dentro de la Caldera de Taburiente se muestrearon tres puntos: Fuente de La Mula, (los aislados de esta zona pertenecen al grupo de *M. amorphae*, excepto uno designado al grupo de *M. caraganae*); Mirador Las Chozas (aquí los aislados se encuentran distribuidos por igual en *M. ciceri* y *M. opportunistum*, encontrando también un aislado designado al grupo de *R. leguminosarum*); y Bejenado, cuyos aislados pertenecen a *M. caraganae*, *M. ciceri* y alguna especie no definida de *Mesorhizobium*.

Hacia la zona Norte, se realizó un muestreo en el Barranco de Briestas; todos los aislados de esta zona correspondieron al grupo de *M. gobiense*, con excepción de uno designado como *M. amorphae*. Finalmente, hacia la zona Sur, el Barranco de Los Hombres, donde encontramos los aislados distribuidos por igual en *M. caraganae* y *M. opportunistum*, así como un aislado del género *Mesorhizobium* cuya especie no fue definida.

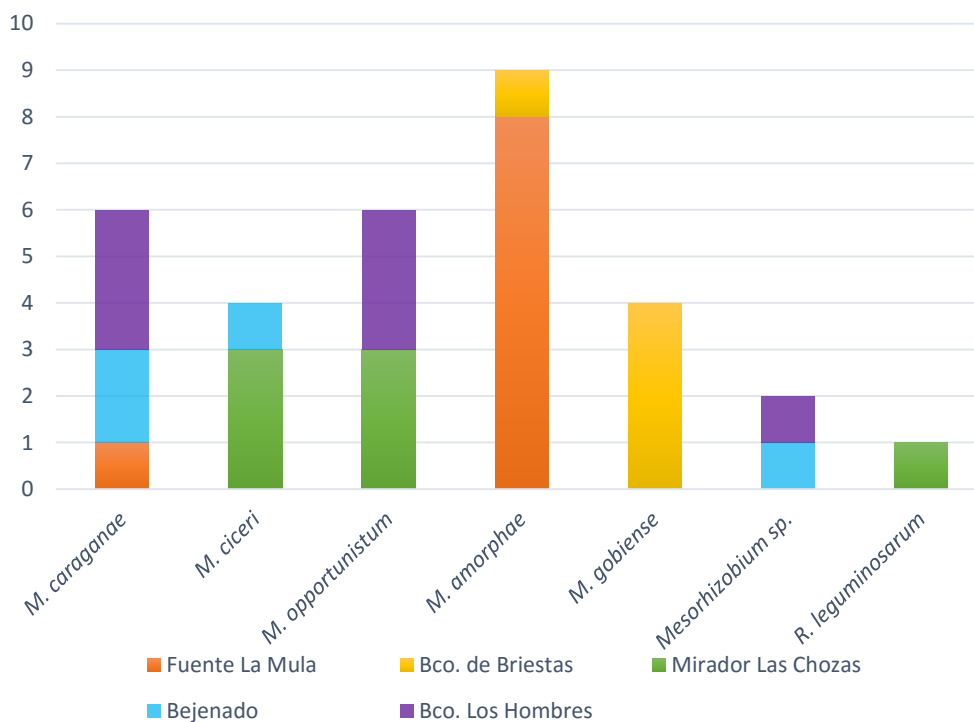


Figura 5. Distribución de los rizobios aislados de *L. hillebrandii* en las distintas localidades de la isla de La Palma.

En resumen, el uso de la técnica RFLP con tres endonucleasas, junto al consiguiente análisis de los perfiles de restricción es una técnica que nos ha permitido poner de manifiesto la gran diversidad genética existente entre los rizobios que nodulan *L. campylocladus* de ambas subespecies, diferenciándose seis grupos principales del género *Mesorhizobium* y dos del género *Rhizobium*. No obstante, estos resultados deben ser confirmados mediante la obtención de sus secuencias.

3.- Test de nodulación en *L. campylocladus* y *L. hillebrandii*.

Para comprobar que las bacterias aisladas eran verdaderos simbioses, capaces, por tanto, de reinfestar los hospedadores originales, se realizó un test de nodulación en las dos subespecies seleccionando los aislados en función del ribotipo al que pertenecen y la localidad de origen. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Cepas, localización y algunas características fenotípicas de los aislados

Aislado	Localización ^a	16S-RFLP ^b	Fenotipo en <i>L. campylocladus</i>			Fenotipo en <i>L. hillebrandii</i>		
			FS	PN	TP	FS	PN	TP
LCA1	V	Mci	Nod+/Fix+	30	1-5	Nod+/Fix+	70	3-6
LCA2	Gu	Mci						
LCA3	Gu	Rleg						
LCA4	Gu	NI						
LCA5	Gu	Mci	Nod-	0	1-6	Nod+/Fix+	30	1-4
LCA6	Gu	Mci						
LCA7	Gu	Mopp						
LCA8	Gu	Mci						
LCA9	Gu	Rleg						
LCA10	Gu	Mcar						
LCA11	Gu	Mcar						
LCA13	Gu	Mgob	Nod+/Fix+	20	1-5	Nod+/Fix±	20	1-5
LCA14	Gu	NI						
LCA15	Gu	Msp						
LCA16	Gu	Mcar						
LCA17	R	Malh						
LCA18	R	Malh	Nod+/Fix+	83	1-3	Nod+/Fix+	50	1-3
LCA20	R	Malh						
LCA21	R	Malh	Nod-	0	1-3	Nod+/Fix+	30	1-3
LCA22	R	Msp						
LCA23	R	Msp						
LCA24	V	Mgob						
LCA25	V	Mgob	Nod+/Fix+	50	1-5	Nod+/Fix+	40	1-3
LCA26	V	Mgob						
LCA27	V	NI	Nod-	0	1-4	Nod-	0	2
LCA28	V	NI						
LHILP1	FM	Mam						
LHILP2	FM	Mam						
LHILP3	FM	Mam						
LHILP4	FM	Mam						
LHILP5	FM	Mam						
LHILP6	FM	Mam						
LHILP7	FM	Mam	Nod+/Fix+	33	2-4	Nod+/Fix+	67	1-3
LHILP8	FM	Mcar	Nod+/Fix+	33	3-4	Nod+/Fix+	50	3-4
LHILP9	FM	Mam						
LHILP10	FM	Mam						
LHILP11	Br	Mgob						
LHILP12	Br	Mgob						
LHILP13	Br	Mgob	Nod+/Fix±	100	>7	Nod+/Fix+	100	3-7
LHILP15	Br	Mgob						
LHILP16A	MC	Rleg						
LHILP17	MC	Mci						
LHILP18A	MC	Mci						
LHILP19A	MC	Mopp						
LHILP19B	MC	NI						
LHILP20	MC	NI						
LHILP21	MC	Mopp						
LHILP22	MC	Mci	Nod+/Fix±	30	1-3	Nod+/Fix+	100	1-4
LHILP23A	MC	NI						
LHILP24	MC	Mopp	Nod+/Fix+	33	3	Nod+/Fix+	10	2-4
LHILP25	Be	Mci						
LHILP26	Be	Mcar						

Tabla 6 (Continuación)

Aislado	Localización ^a	16S-RFLP ^b	Fenotipo en <i>L. campylocladus</i>			Fenotipo en <i>L. hillebrandii</i>		
			FS	PN	TP	FS	PN	TP
LHILP27	Be	Mcar	Nod+/Fix+	66	1-7	Nod+/Fix+	83	1-4
LHILP28A	Be	Msp						
LHILP29	BH	Mopp	Nod+/Fix+	33	3-4	Nod+/Fix+	33	1-5
LHILP30	BH	Mopp						
LHILP31	BH	Mcar						
LHILP32	BH	Mopp						
LHILP35	BH	Mcar						
LHILP37	BH	Msp						
LHILP38	BH	NI						
LHILP39	BH	Mcar						

FS: Fenotipo simbiótico; PN: Porcentaje de plantas noduladas; TP: Tamaño de la planta en centímetros.

- (a) Localización: Gu: La Guancha, R: Los Realejos, V: Vilaflor, FM: Fuente de La Mula, Br: Barranco de Briestas, MC: Mirador de Las Chozas, Be: Bejenado, BH: Barranco de los Hombres.
 (b) Grupo 16S-RFLP: NI: No identificado; Rleg: *R. leguminosarum*; Mopp: *M. opportunistum*; Mgob: *M. gobiense*; Mcar: *M. caraganae*; Malh: *M. alhagi*; Mam: *M. amorphae*; Mci: *M. ciceri*; Msp: *Mesorhizobium* sp.

Con estos test de nodulación confirmamos que, aun siendo el porcentaje de nodulación bajo en algunos casos, las cepas seleccionadas fueron capaces de nodular en ambas subespecies de *L. campylocladus*, (Tabla 6). A excepción de LCA5 (ribotipo *M. ciceri*) y LCA21 (ribotipo *M. alhagi*) que siendo aislados de *L. campylocladus*, que no nodularon, lo que pudo deberse a las condiciones en las que se encontraban. En cuanto al aislado LCA27, también fue incapaz de nodular, pero este hecho no resulta sorprendente ya que presenta una relación lejana con los rizobios ($S_D=44,7\%$).

Así mismo, una observación visual de la parte aérea y de la raíz de las plantas, en comparación con los controles sin inocular, así como el recuento del número de nódulos, nos permitió hacer una primera estimación de las cepas con mejores capacidades fijadoras de nitrógeno de entre los aislados ensayados, destacando las plantas inoculadas con el aislado LHILP13, el crecimiento de la parte aérea fue superior al resto, encontrándose en muy buen estado, además se produjo la nodulación en el 100% de las plantas con 1 - 6 nódulos por planta, la gran mayoría con un tono rojizo, lo que indica actividad de fijación de nitrógeno. Tabla 6.



Figura 6. Test de infectividad realizado con *Lotus campylocladus*, a la izquierda se encuentra el control negativo y a la derecha el ensayo realizado con el aislado LHILP13.

CONCLUSIONES

1. En este trabajo se han aislado 68 cepas a partir de nódulos radicales de *L. campylocladus* y *L. hillebrandii* en las islas de Tenerife y La Palma, respectivamente. El 75 por ciento pertenecen al género *Mesorhizobium*. Del resto, tres pertenecen al género *Rhizobium* y los otros son bacterias próximas a los géneros *Sinorhizobium* (2), *Bradyrhizobium* (1), *Phyllobacterium* (1) y un linaje distante a los rizobios (4).
2. Los aislados del género *Mesorhizobium* pertenecen, al menos, a siete especies que se clasifican en, o son especies próximas a, *M. caraganae* (9), *M. ciceri* (9), *M. amorphae* (9), *M. gobiense* (8), *M. opportunistum* (7), *M. alhagi* (4) y una especie no identificada (5).
3. Los grupos *M. opportunistum* y *M. amorphae* presentan varios perfiles de restricción, lo que sugiere que estén formados por más de una especie.
4. En cuanto a la distribución biogeográfica de genotipos por islas, *M. amorphae* es exclusivo de la isla de La Palma y *R. lusitanum* y *M. alhagi*, de Tenerife. En esta última predominan *M. ciceri*, *M. alhagi* y *M. gobiense* y en la isla de La Palma la especie predominante es *M. amorphae*. Dentro de cada isla, algunos genotipos son exclusivos de localidad y otros se encuentran en todas o en la mayor parte de las localidades de las dos islas.
5. Los tests de reinfección mostraron que todos los mesorizobios son verdaderos microsimbiontes de estos *Lotus*, a excepción de tres cepas que probablemente sean

endófitos. En las condiciones de ensayo, la de mejor comportamiento simbiótico fue la cepa LHILP13 del grupo *M. gobiense*.

CONCLUSIONS

1. We isolated 68 bacterial strains from root nodules of *L. campylocladus* and *L. hillebrandii* from Tenerife and La Palma islands respectively. A 75 per cent of them belongs to *Mesorhizobium* genus. The rest was distributed as follows: three belong to *Rhizobium* genus and the remaining were close to *Sinorhizobium* (2), *Bradyrhizobium* (1), *Phyllobacterium* (1) genera or to an unidentified lineage (4).
2. The isolates belonging to *Mesorhizobium* genus are distributed between, at least, seven species classified as, or related to *M. caraganae* (9), *M. ciceri* (9), *M. amorphae* (9), *M. gobiense* (8), *M. opportunistum* (7), *M. alhagi* (4) and an unidentified (5) species.
3. *M. opportunistum* and *M. amorphae* groups present various restriction profiles, suggesting that they include more than one species.
4. Regarding to the biogeographic distribution of the various genotypes, *M. amorphae* is unique to La Palma island and *R. lusitanum* and *M. alhagi* to Tenerife. In this island *M. ciceri*, *M. alhagi* and *M. gobiense* predominated, while in La Palma *M. amorphae* was predominating. Inside each island, some genotypes are unique to locations and others could be found in all or the major part of locations from both islands.
5. The reinfection tests show that all the *Mesorhizobium* isolates were true microsymbionts from these *Lotus*, with the exception of three isolates that could be endophytic bacteria. In the essay conditions used in this work, the LHILP13 strain belonging *M. gobiense* group shows the best symbiotic behavior.

BIBLIOGRAFÍA

- Allan, G. J., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra A., Boerner, E. y Zimmer E. A. 2004. Molecular phylogenetic evidence for the geographic origin and classification of Canary Island *Lotus* (Fabaceae: Loteae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **32**: 123-138.
- Allan G. J., Zimmer E. A., Wagner W. L. y Sokoloff D. D. 2003. Molecular phylogenetic analyses of tribe Loteae (Leguminosae): implications for classification and biogeography. En: *Advances in Legume Systematics. Parte 10, Higher Level Systematics*. Klitgaard B. B. y Bruneau A. (editores): 371-393. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Arambarri A. M. 2000. A cladistic analysis of the Old World species of *Lotus* (Fabaceae: Loteae). *Canadian Journal of Botany*. **78**: 351-360.
- Armas-Capote N., Pérez-Yépez J., Martínez-Hidalgo P., Garzón-Machado V., del Arco-Aguilar M. y Velázquez E. 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). *Systematic and Applied Microbiology*. **37**: 140-148.
- Barrientos L., Higuera M., Acuña H., Guerrero J., Ortega F. y Seguel I. 2002. Symbiotic effectiveness of indigenous strains of *Mesorhizobium loti* and *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) in the three *Lotus* plant species. *Agricultura Técnica*. **62**(2): 226-236.
- Beijerinck M. W. 1888. Cultur des *Bacillus radicola* aus den Knöllchen. *Bot. Ztg.* **46**: 740-750.
- Bramwell D. y Bramwell Z. 1974. *Wild Flowers of the Canary Islands*. London: Burford.
- Carracedo, J. C. 1994. The Canary Islands: An example of structural control on the growth of large oceanic-island volcanoes. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*. **60**: 225-241.
- Chen W. X., Yan G. H. y Li J. L. 1988. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **38**: 392-397.
- de Lajudie P., Laurent-Fulele E., Willems A., Torck U., Coopman R., Collins M. D., Kersters K., Dreyfus B. y Gillis M. 1998. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **48**: 1277-1290.
- de Lajudie P., Willems A., Pot B., Dewettinck D., Maestrojuan G., Neyra M., Collins M. D., Dreyfus B., Kersters K. y Gillis M. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **44**: 715-733.
- De Ley J. y Rassel A. 1965. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. *Journal of General Microbiology*. **41**: 85-91.
- Degtjareva G. V., Kramina T. E., Sokoloff D. D., Samigullin T. H., Valiejo-Roman C. M. y Antonov A. S. 2006. Phylogeny of the genus *Lotus* (Leguminosae, Loteae): evidence from nrITS sequences and morphology. *Canadian Journal of Botany*. **84**: 813-830.
- Dreyfus B., Garcia J. L. y Gillis M. 1988. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **38**: 89-98.
- Elkan G. H. y Bunn C. R. 1992. Capítulo 107: The rhizobia. En: *The Prokaryotes. A handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W. y Schleifer K-H (editores): 2197-2213. Springer-Verlag, New York.
- Estrella M. J., Muñoz S., Soto M. J., Ruiz O. y Sanjuán J. 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin. *Applied and Environmental Microbiology*. **75**: 1088-98.

- Farrand S. K., van Berkum P. B. y Oger P. 2003. *Agrobacterium* is a definable member of the family *Rhizobiaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**: 1681-1687.
- Frank B. 1889. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber. Deut. Bot. Ges.* **7**: 332-346.
- Fulchieri M. M., Estrella M. J. y Iglesias A. A. 2001. Characterization of *Rhizobium loti* strains from the Salado River Basin. *Antonie van Leeuwenhoek*. **79**:119-125.
- Gillett J. B. 1958. *Lotus* in Africa South of the Sahara (excluding the Cape Verde Islands and Socotra) and its distinction from *Dorycnium*. *Kew Bulletin*. **3**: 361-381.
- Graham P. H. 1963. Antigenic affinities of the root-nodule bacteria of legumes. *Antonie van Leeuwenhoek*. **29**: 281-291.
- Graham P. H. 1964. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. *Journal of General Microbiology*. **35**: 511-517.
- Grossmann J. A., Markmann K., Brachmann A., Rose L. E. y Parniske M. 2012. Polymorphic infection and organogenesis patterns induced by a *Rhizobium leguminosarum* isolate from *Lotus* root nodules are determined by the host genotype. *New Phytology*. **196**: 561-573.
- Han T. X., Wang E. T., Wu L. J., Chen W. F., Gu J. G., Gu C. T., Tian C. F. y Chen W. X. 2008. *Rhizobium multihospitium* sp. nov., isolated from multiple legume species native of Xinjiang, China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **58**: 1693-1699.
- Heyn C. C. y Herrnstadt I. 1968. The *Lotus creticus* group. *Kew Bulletin*. **21**: 229-309.
- Jarabo-Lorenzo A., Velázquez E., Pérez-Galdona R., Vega-Hernández M. C., Martínez-Molina E., Mateos P. F., Vinuesa P., Martínez-Romero E. y León-Barrios M. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rDNA and low molecular weight RNA profiling in the characterisation of rhizobial isolates from shrubby legumes endemic to the Canary Islands. *Systematic and Applied Microbiology*. **23**: 418-425.
- Jarvis B. D. W., Pankhurst C. E. y Patel. J. J. 1982. *Rhizobiurn loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **32**: 378-380.
- Jarvis B. D. W., van Berkum P, Chen W. X., Nour S. M., Fernandez M. P., Cleyet-Marel J. C. y Gillis M. 1997. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **47**: 895-898.
- Jordan D. C. 1982. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **32**: 136-139.
- Kramina T. E. 1999a. Taxonomic revision of *Lotus* L. section *Lotus* (Leguminosae) in the territory of European Russia and adjacent countries. PhD Thesis: Moscow State University. Rusia.
- Kramina T. E. 1999b. A contribution to the taxonomic revision of the *Lotus corniculatus* complex (Leguminosae, Loteae) in the European part of the former USSR. *Systematics and Geography of Plants*. **68**: 265-279.
- Kramina T. E. y Sokoloff D. D. 2004. A taxonomic study of *Lotus australis* complex (Leguminosae), with special emphasis on plants from Pacific Ocean islands. *Adansonia*. **26**: 171-197.
- Kuykendall L. D., Saxena B., Devine T. E. y Udell S. E. 1992. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*. **38**: 501-505.
- León-Barrios M., Lorite M. J., Donate-Correa J. y Sanjuán J. 2009. *Ensifer meliloti* bv. *lancerottense* establishes nitrogen-fixing symbiosis with *Lotus* endemic to the Canary Islands and shows distinctive symbiotic genotypes and host range. *Systematic and Applied Microbiology*. **32**: 413-420.
- Lindström K., Mousavi S. A., Willems A., Nesme X. y de Lajudie P. 2015. Revised phylogeny of Rhizobiaceae: proposal of the delineation of *Pararhizobium* gen. nov., and 13 new species combinations. *Systematic and Applied Microbiology*. **38**: 84-90.

- Lloret L. y Martínez-Romero E. 2005. Evolución y filogenia de *Rhizobium*. Revista Latinoamericana de Microbiología. **60**: 43-60.
- Lorite M. J., Donate-Correa J., del Arco-Aguilar M., Galdona R. P., Sanjuán J. y León-Barrios M. 2010. *Lotus* endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. Systematic and Applied Microbiology. **33**: 282-290.
- Merabet C., Martens M., Mahdhi M., Zakhia F., Sy A., Le Roux C., Domergue O., Coopman R., Bekki A. y otros autores. 2010. Multilocus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **60**: 664-674.
- Moffet M. L. y Colwell R. R. 1968. Adansonian analysis of the *Rhizobiaceae*. Journal of General Microbiology. **51**: 245-266.
- Peix A, Ramírez-Bahena MH, Pérez-Galdona R, Velázquez E, León-Barrios M. 2011. Nuevos enfoques metodológicos aplicados al análisis de la biodiversidad e identificación de especies de rizobacterias. En: Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas plantas-microorganismos. Megías-Guijo M., Rivilla-Palma R., Soto-Misffut M. J., Delgado-Igeño M. J., González-García E., Mateos-González P. F., León-Barrios M., Rodelas-González B. y Bedmar-Gómez E. J. (Editores): 345-360. GRX Servicios Gráficos, Granada, España.
- Rejili M., Lorite M. J., Mahdhi M., Sanjuan Pinilla J., Ferchichi A. y Mars M. 2009. Genetic diversity of rhizobial populations recovered from three *Lotus* species cultivated in the infra-arid Tunisian soils. Progress in Natural Science. **19**: 1079-1087.
- Rejili M., Mahdhi M., Fterich A., Dhaoui S., Guefrachi I., Abdeddayem R. y Mars M. 2012. Symbiotic nitrogen fixation of wild legumes in Tunisia: soil fertility dynamics, field nodulation and nodules effectiveness. Agriculture, Ecosystems & Environment. **157**: 60-69.
- Rivas R.; García-Fraile P. y Velázquez E. 2009. Taxonomy of Bacteria Nodulating Legumes. Microbiology Insights. **2**, 51.
- Rivas R., Willems A., Palomo J. L., García-Benavides P., Mateos P. F., Martínez-Molina E., Gillis M. y Velázquez E. 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **54**: 1271-1275.
- Sandral G, Remizowa MV y Sokoloff DD. 2006. A taxonomic survey of *Lotus* section *Pedrosia* (Leguminosae, Loteae). Wulfenia. **13**: 97-192.
- Saeki K. y Kouchi H. 2000. The *Lotus* symbiont, *Mesorhizobium loti*: molecular genetic techniques and application. Journal of Plant Research. **113**: 457-465.
- Schrire B. D., Lavin M. y Lewis G. P. 2005a. Global distribution patterns of the Leguminosae: insights from recent phylogenies. En: Plant diversity and complexity patterns: local, regional and global dimensions. Friis I. y Balslev H. (Editores): 375-422. Biologiske Skrifter.
- Sokoloff D. D. y Lock J. M. 2005. Tribe Loteae. En: Legumes of the world. Lewis G., Schrire B., Mackinder B. y Lock M. (Editores): 455-466. Bath Press, United Kingdom.
- Sprent, J. I. 2007. Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. New Phytology. **174**: 11-25.
- Sullivan J. T., Eardly B. D., van Berkum P. y Ronson, C. W. 1996. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. Applied and Environmental Microbiology. **62**: 2818-2825.
- †Mannetje L. 1967. A re-examination of the taxonomy of the genus *Rhizobium* and related genera using numerical analysis. Antonie van Leeuwenhoek. **33**: 477-491.

Vincent J. M. 1970. A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publications. 164p. Oxford, Reino Unido.

Vincent J. M. y Humphrey B. A. 1970. Taxonomically significant group antigens in *Rhizobium*. Journal of General Microbiology. **63**: 379-382.

Vinuesa P., León-Barrios M., Silva C., Willems A., Jarabo-Lorenzo A., Pérez-Galdona R., Werner D. y Martínez-Romero E. 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **55**: 569-575.

Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A. y Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. **173**: 697-703.

Willems, Anne. 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant and Soil. **287**: 3-14.

Xu M. L., Ge C., Cui Z., Li J. y Fan H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. International Journal of Systematic Bacteriology. **45**: 706-711.

Yao Z. Y., Kan F. L., Wang E. T., Wei G. H. y Chen W. X. 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species within the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **52**: 2219-2230.

Young J. M., Kuykendall L. D., Martínez-Romero E., Kerr A. y Sawada H. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. **51**: 89-103.

Zakhia F., Jeder H., Domergue O., Willems A., Cleyet-Marel C. J., Gillis M., Dreyfus B. y De Lajudie P. 2004. Characterisation of wild legume nodulating bacteria (LNB) in the infra-arid zone of Tunisia. Systematic and Applied Microbiology. **27**: 380-395.

<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap8/> 13/04/16

<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia> 28/06/16