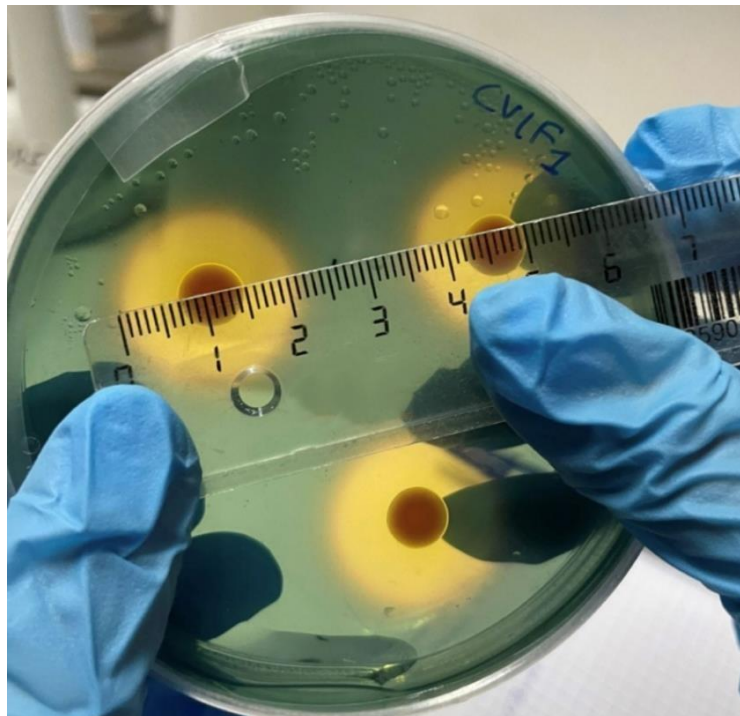


**Rizobios eficaces,
leguminosas nativas de Canarias y restauración de
hábitats.**

**Effective Rhizobia,
native legumes of the Canary Islands and habitat
restoration.**



Trabajo de Fin de Grado

Sara Pérez González

Tutorizado por Milagros León Barrios

Julio 2022

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Restauración de hábitats y microbiota del suelo.....	3
1.2. Leguminosas y restauración de hábitats.....	3
1.3. Fijación de nitrógeno.	5
1.4. Microbioma de los nódulos.	5
1.5. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	7
2. OBJETIVOS.....	10
3. MATERIAL Y MÉTODOS	10
3.1. Bacterias seleccionadas para este estudio.....	10
3.2. Medios de cultivo empleados.	10
3.3. Experimentos de nodulación.	12
3.4. Caracterización filogenética.	12
3.5. Estudio de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal.	13
3.6. Antibiosis.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
4.1. Bacterias utilizadas en este trabajo.	15
4.2. Ensayos de reinfección en las leguminosas hospedadoras.	16
4.3. Identificación de los aislados: Análisis filogenético.	19
4.4. Estudio de las bacterias promotoras del crecimiento.	22
5. CONCLUSIONES	28
6. BIBLIOGRAFÍA.....	29

Resumen

En los suelos erosionados y degradados con cobertura vegetal escasa, las repoblaciones vegetales suelen ser un fracaso. Sin embargo, hay otras maneras de abordarlo, como la plantación conjunta de la especie vegetal con su microbiota particular, una estrategia con la que se consiguen repoblaciones más exitosas. En suelos áridos pobres en nitrógeno, como los de Lanzarote, la simbiosis rizobio-leguminosa es una alternativa muy prometedora, tanto por el aporte de nitrógeno, como por las propiedades promotoras del crecimiento vegetal presentes en los rizobios endosimbiontes y en diversos endófitos asociados a la raíz. En el presente trabajo hemos analizado la diversidad genética de la microbiota asociada a los nódulos radicales de tres especies de leguminosas nativas de Lanzarote, hemos evaluado algunas de sus propiedades promotoras del crecimiento vegetal y su capacidad de nodulación. Los resultados obtenidos demuestran la dificultad para obtener *in vitro* rizobios de leguminosas silvestres y la presencia en los nódulos radicales de una variedad de bacterias endófitas que presentan propiedades promotoras del crecimiento vegetal.

Palabras clave: repoblación, simbiosis, leguminosa, rizobio, endófito.

Abstract

In eroded and degraded soils with sparse vegetation cover, plant revegetation is often a failure. However other strategies, such as the joint planting of the plant species with its particular microbiota, lead to more successful revegetations. In arid soils poor in nitrogen, such as those of Lanzarote, the rhizobium-legume symbiosis is a very promising alternative due to the contribution of nitrogen and other resources thanks to plant growth-promoting properties present both in the endosymbiont rhizobia, and in various root endophytes. In the present work we have analyzed the genetic diversity of the microbiota associated with the root nodules of three species of legumes native to Lanzarote, we have evaluated some of their plant growth-promoting properties and their nodulation capacity. The results obtained demonstrate the difficulty to obtain *in vitro* rhizobia from wild legumes, and the presence in the root nodules of a variety of endophytic bacteria with plant growth promoting properties.

Key words: revegetation, symbiosis, legume, rhizobia, endophyte.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Restauración de hábitats y microbiota del suelo.

Las plantas llevan asociadas a sus raíces una compleja comunidad de microorganismos beneficiosos: el microbioma de la planta. Este microbioma es a veces referido como “*el segundo genoma de la planta*” ya que es crucial para su nutrición, defensa frente a patógenos y productividad (Berendsen *et al.*, 2012; Fitzpatrick *et al.*, 2018). Cada planta configura el microbioma de su rizosfera a partir de la microbiota presente en los suelos, reclutando aquellos microorganismos que le resultan beneficiosos (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015), esto es, una cohorte de bacterias y hongos que la acompañan y le permiten afrontar las condiciones del medio físico externo. Por lo tanto, las plantas no deben ser consideradas entidades independientes, sino que el genoma de la planta junto con el de su microbiota conforman un holobionte (Vandenkoornhuysen *et al.*, 2015), es decir, una asociación de diferentes especies que resultan en una unidad ecológica.

En suelos muy erosionados y degradados, la cobertura vegetal es escasa y la microbiota está muy empobrecida, lo que explica muchos fracasos en las repoblaciones vegetales. Por tanto, en los programas de restauración de estos hábitats plantar no es suficiente: el éxito en las estrategias de plantación depende de introducir junto con las plantas su microbiota particular (Gopal & Gupta, 2016). Esto se puede abordar mediante la transferencia de suelos “sanos” a las áreas degradadas, que aportan la microbiota perdida (Bulot *et al.*, 2014; Wubs *et al.*, 2016). Otra alternativa es el uso de inoculantes microbianos, que previamente aislados en suelos sanos y cultivados, se incorporan al suelo. En esta estrategia se suele hacer una selección de aquellos grupos de microorganismos más esenciales para el desarrollo vegetal (Gopal & Gupta, 2016).

1.2. Leguminosas y restauración de hábitats.

Las leguminosas forman una amplia familia denominada Fabaceae, la tercera más grande de angiospermas con unas 20.000 especies y 750 géneros. Se encuentran en todos los continentes y son capaces de crecer en ambientes acuáticos y terrestres muy diversos, bajo diferentes condiciones edáficas y climáticas. Desde el punto de vista ecológico, el estudio de las leguminosas es de gran importancia debido a su capacidad para establecer simbiosis con los rizobios, que, tras colonizar sus raíces, desencadenan un complejo proceso que les permite llevar a cabo la fijación del nitrógeno atmosférico, reduciendo la necesidad de fertilización

química para las leguminosas y enriqueciendo los suelos pobres en nitrógeno, con el consiguiente beneficio para todo el ecosistema (Brockwell *et al.*, 1995; Zahran, 1999).

Con fines de restauración de un hábitat muy erosionado en suelos de Lanzarote, los altos de Famara, en el presente trabajo se han seleccionado 3 especies nativas de leguminosas, *Coronilla viminalis*, *Bituminaria bituminosa*, y *Lotus lancerottensis*. Lanzarote es una isla extremadamente árida, con una tasa de precipitación muy escasa, suelos alcalinos, salinos en algunas zonas, y con procesos erosivos muy intensos. Todo ello provoca pérdidas anuales de suelo elevadas y la disminución de la cobertura vegetal. En particular el suelo de Famara presenta pH básico por encima de 9, es carbonatado y muy pobre en materia orgánica, nitrógeno y fósforo, aunque sin problemas de salinidad (León-Barrios *et al.*, 2017).

Además de la limitación de nutrientes esenciales, las condiciones adversas debidas a estreses bióticos y abióticos son los factores principales que limitan la productividad de las plantas. Entre los distintos tipos de estreses, la sequía y la salinidad son factores principales que afectan a la fertilidad del suelo, limita el establecimiento y crecimiento de las plantas. Estas condiciones se dan especialmente en zonas áridas y semi-áridas con altas tasas de evaporación, bajas precipitaciones, altas temperaturas, mala calidad del suelo y carencia de gestión del riego, tal y como es el caso de la isla de Lanzarote.

Este tipo de estreses supone ya un gran reto para la gestión ambiental de un hábitat, pero los suelos de Lanzarote son, además, especialmente pobres en nitrógeno. Por tanto, una buena estrategia en la restauración de ecosistemas tan pobres en este elemento es la inoculación con rizobios, que, como ya comentamos, mediante la fijación de nitrógeno en simbiosis con leguminosas, enriquecen los suelos en nitrógeno.

A pesar de que las leguminosas incluyen miles de especies, la mayoría de los estudios de la simbiosis rizobio-leguminosa se han limitado a especies de interés agrícola. Ha sido en las últimas dos décadas cuando han aumentado los estudios de rizobios aislados de leguminosas silvestres por su interés ecológico, pero aún son escasos los ensayos de biodiversidad y de eficacia simbiótica realizados. También hay que tener en cuenta que las simbiosis rizobio-leguminosa son específicas, de manera que cada leguminosa es nodulada por un grupo específico de rizobios, y la eficacia para fijar el nitrógeno puede variar de una cepa a otra dentro de una misma especie, lo que hace necesario la selección de las cepas fijadoras más eficaces para una especie de leguminosa en particular, mediante experimentación *in vitro* e *in vivo*.

1.3. Fijación de nitrógeno.

El nitrógeno (N) es el elemento más abundante de la atmósfera terrestre. Sin embargo, suele ser una fuente nutritiva limitante para el desarrollo de las plantas, ya que solo lo incorporan en formas de nitrato o de amonio, generalmente escasas en la biosfera. Sin embargo, el nitrógeno atmosférico (N₂), aunque muy abundante, es una molécula prácticamente inerte, que no puede ser aprovechada por las plantas y tampoco por la mayoría de seres vivos. Únicamente un conjunto de procariontes, los diazotófos, son capaces de fijar el N₂, a través del proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN). Muchos diazotófos fijan el nitrógeno en vida libre, pero otros sólo lo fijan en simbiosis con plantas, como es el caso de los rizobios y las leguminosas.

Aunque existen grandes diferencias en la morfología y fisiología de los organismos fijadores de nitrógeno, el proceso de fijación y el sistema enzimático que lo lleva a cabo es similar en todos ellos. Este sistema, denominado nitrogenasa, está formado por dos subunidades, la dinitrogenasa, y la dinitrogenasa reductasa. La reacción que cataliza, $N_2 + 8H^+ + 16 MgATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + Mg16ADP + 16Pi$, requiere una gran cantidad de energía para romper el triple enlace que une los dos átomos de N₂ (Fernández-Pascual, de María, & Felipe 2002).

1.4. Microbioma de los nódulos.

1.4.1. Rizobios

Los rizobios son bacilos Gram negativos aerobios, que pueden vivir libres en el suelo como saprófitos, o establecer una simbiosis específica con leguminosas que les permite fijar el nitrógeno atmosférico, como comentamos anteriormente. El proceso de infección es muy complejo, de manera resumida, comienza cuando el rizobio coloniza la rizosfera de su leguminosa hospedadora e infecta su raíz, y culmina con la generación de una estructura especializada, el nódulo radical, donde el rizobio fija el nitrógeno. Según su morfología los nódulos radicales se clasifican en dos tipos principales, indeterminados, con morfología cilíndrica, debido al crecimiento continuado del meristemático apical, como ocurre en la *Coronilla*; y determinados, redondos, donde el crecimiento tiene lugar por expansión de las células infectadas en la zona central del nódulo, como los de *Bituminaria*. La morfología de los nódulos es una característica que depende de la leguminosa (Sprenst, 2007).

Una característica importante de la nitrogenasa es que la subunidad dinitrogenasa reductasa es muy sensible al oxígeno, inhibiéndose de manera irreversible en su presencia.

Paradójicamente, muchos fijadores de N₂ son aerobios estrictos. Para solventarlo, los fijadores libres usan una variedad de mecanismos que regulan la concentración de oxígeno (Oelze, 2000; Ureta & Nordlund, 2002). En cuanto a los diazótrofos simbióticos, como los rizobios, el control del oxígeno se logra en los nódulos radicales, donde se genera un ambiente microaerófilo gracias a la síntesis de una proteína simbiótica, la leghemoglobina (Rutten & Poole, 2019), que controla el nivel de oxígeno permitiendo el funcionamiento de la nitrogenasa, en rizobios ya diferenciados a bacteroides.

1.4.2. Bacterias endófitas de los nódulos radicales

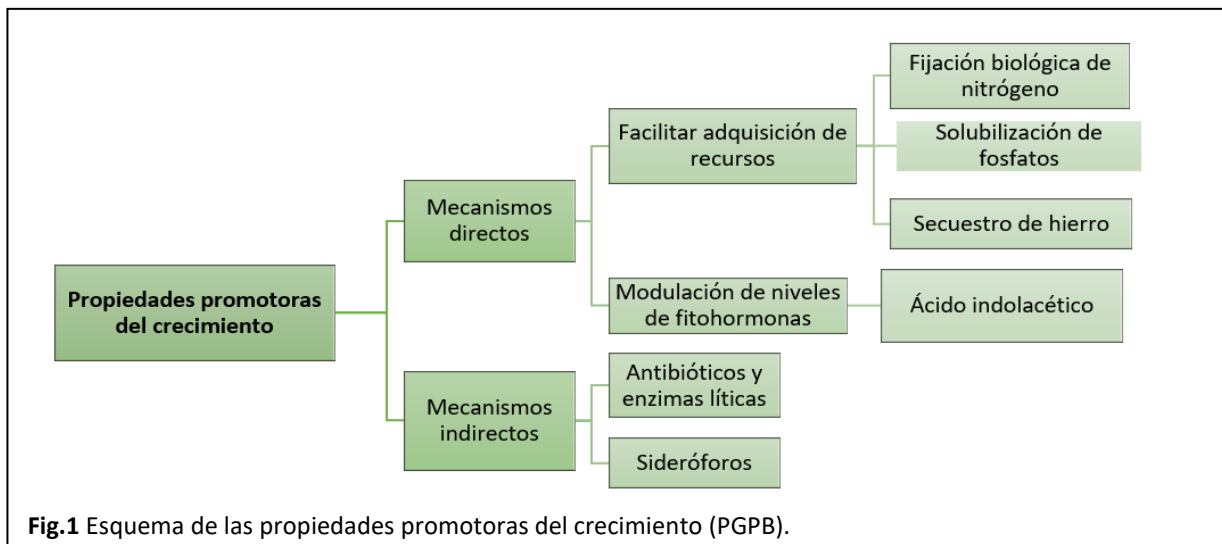
Hasta hace unos años se creía que los rizobios eran los únicos habitantes del nódulo radical. Sin embargo, con frecuencia se aíslan también otras bacterias distintas a los rizobios dentro de los nódulos (Martínez-Hidalgo & Hirsch, 2017; Muresu *et al.*, 2008, 2019; Soares *et al.*, 2020; Zheng *et al.*, 2020). Estas bacterias no son capaces de reinfectar por sí solas a las leguminosas y formar nódulos, por lo que no son verdaderos rizobios, y son sorprendentemente muy diversas. Por ejemplo, Zheng *et al.*, 2020, identificaron 18 géneros bacterianos y 55 especies en muestras de nódulos de tres especies de leguminosas. Los géneros de estas bacterias endófitas aisladas de nódulos incluyen mayoritariamente bacterias del género *Agrobacterium* y también otros géneros como *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Bacillus* o *Paenibacillus* (Martínez-Hidalgo & Hirsch, 2017). En cuanto a la localización en la planta, si bien generalmente el mayor número de bacterias endófitas se encuentra en las raíces, también se ha reportado colonización en tallos, semillas, hojas, frutos, tubérculos, órganos reproductivos y en el interior de nódulos. No está claro el papel que desempeñan estas bacterias dentro del nódulo, pero como otras muchas bacterias endófitas, podrían ser importantes para la planta. En general, las bacterias endófitas son ubicuas en la mayoría de las especies vegetales, residiendo de forma latente o colonizando activamente los tejidos de las plantas, tanto a nivel local como sistémico. Históricamente, se había pensado que las bacterias endófitas eran patógenas de plantas, pero se ha descubierto que tienen diversos efectos beneficiosos sobre las plantas huésped, tal y como la promoción del crecimiento, una mayor resistencia contra patógenos y parásitos. De esta manera, pueden jugar un papel fundamental en la adaptación de las plantas al medio ambiente (Hallmann *et al.*, 1997).

En resumen, se puede concluir que los endófitos vegetales, incluidos los que viven en los nódulos de las leguminosas, pueden tener un gran potencial como bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Ahora bien, la presencia de mecanismos de promoción del crecimiento

vegetal *in vitro*, no garantiza una actividad de promoción del crecimiento vegetal *in vivo*, y viceversa. Por lo tanto, la capacidad de promoción del crecimiento de la planta debe ser analizada *in vivo* con el fin de seleccionar cepas endofíticas de nódulos para la inoculación en leguminosas y no leguminosas.

1.5. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.

El aumento del rendimiento agrícola ha conducido al uso masivo de fertilizantes y plaguicidas químicos, causando daños irreversibles en la calidad y fertilidad del suelo. Por ello, esta situación ha incentivado la búsqueda de nuevas alternativas que mejoren estos problemas implementando un mayor interés en una agricultura sostenible, optando por un medio más seguro y productivo (Gouda *et al.*, 2018). Es en este contexto donde adquieren especial relevancia las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPB (del inglés “Plant Growth Promoting Bacteria”). Los mecanismos utilizados por las PGPB para promover el crecimiento de las plantas son diversos, e implican efectos directos en el crecimiento como la síntesis de fitohormonas y la captación de nutrientes, o bien beneficios indirectos a través del control de patógenos (Glick, 2012; Lugtenberg & Kamilova, 2009). Las PGPB son biofertilizantes prometedores para una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente.



1.5.1. Mecanismos directos.

Facilitar la adquisición de nutrientes:

Fijación biológica de nitrógeno. De lo comentado anteriormente, está claro que esta actividad ayuda a suplir a la biosfera con compuestos nitrogenados, y a la vez compensa las pérdidas generadas por efectos de la desnitrificación. Es una alternativa sostenible y

económica que permite disminuir la fertilización química, y suplir las necesidades de nitrógeno de la planta.

Solubilización de fosfato. Después del nitrógeno, el fósforo (P) es el nutriente más limitante para las plantas. Es uno de los principales macronutrientes esenciales para el desarrollo y crecimiento de las plantas, pero también es uno de los elementos menos solubles en el ambiente natural, la mayor parte está en forma de fosfatos insolubles, y menos del 5 % del contenido total de P del suelo está disponible para las plantas (Corrales Ramírez, 2014; Dobbelaere *et al.*, 2003). Muchos microorganismos del suelo poseen la capacidad de transformar el P insoluble en formas asimilables para las plantas, generalmente a través de la producción de ácidos orgánicos de bajo peso molecular, por lo que la solubilización de P es más eficiente en suelos básicos que en suelos naturalmente ácidos (Solano *et al.*, 2008). Las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSF) incluyen bacterias Gram positivas y Gram negativas muy diversas, entre las que destacan como los solubilizadores más eficaces los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Burkholderia* y también *Rhizobium* (Kirui *et al.*, 2022). Entre los rizobios simbióticos, varias especies son buenos solubilizadores; por ejemplo, en el género *Mesorhizobium* destacan *M. ciceri* y *M. mediterraneum* (Rivas *et al.*, 2006).

Producción de sideróforos: Captación de hierro. A pesar de que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la tierra, en los suelos aeróbicos no es asimilado fácilmente por bacterias ni plantas, ya que el ion férrico es escasamente soluble. Tanto los microorganismos como las plantas requieren un alto nivel de hierro. Además, es importante en las plantas expuestas a contaminación por metales pesados, ya que las bacterias productoras de sideróforos mejoran la movilidad del plomo y el cromo, mejorando el rendimiento en la fitoextracción (Braud *et al.*, 2009). Obtener hierro es aún más problemático en la rizosfera, donde plantas, bacterias y hongos compiten por él. Para sobrevivir con un suministro tan limitado, las bacterias sintetizan sideróforos de baja masa molecular, unas pequeñas moléculas peptídicas con cadenas laterales y grupos funcionales a los que se pueden unir los iones férricos (Goswami *et al.*, 2016).

Modulación de los niveles de fitohormonas.

Cuando las plantas encuentran condiciones ambientales que limitan su crecimiento, intentan ajustar los niveles de sus fitohormonas endógenas para disminuir los efectos negativos del estrés ambiental. Sin embargo, los microorganismos de la rizosfera también pueden producir o modular estos niveles, alterando el equilibrio hormonal de la planta.

Ácido Indolacético. Los rizobios y otras bacterias del suelo producen metabolitos secundarios que pueden activar el sistema de respuesta al estrés en plantas. Uno de estos mecanismos es la producción de reguladores del crecimiento vegetal, las auxinas o ácido indolacético (IAA). Se estima que más del 80 % de las bacterias del suelo son capaces de producir auxinas (Patten & Glick, 1996). El IAA liberado por las rizobacterias afecta principalmente al sistema radicular aumentando su tamaño y peso, el número de ramificaciones, y la superficie en contacto con el suelo, lo que conduce a un aumento de la captación de nutrientes y un mayor crecimiento (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2001). De hecho, las plantas bajo estrés muestran una disminución progresiva en el nivel de IAA en su sistema radicular (Shakirova *et al.*, 2003), por lo que la aplicación de auxinas exógenas puede ayudar al desarrollo. Además, el IAA funciona como una molécula de señalización recíproca en las interacciones planta-microbio (Ahmed & Hasnain, 2010) y puede desempeñar un papel fundamental en la nodulación y la capacidad competitiva. Por otro lado, es importante conocer el nivel de IAA sintetizado por la planta porque si es alto, la adición exógena mediada por las bacterias podría inhibir el crecimiento en lugar de promoverlo.

1.5.2. Mecanismos indirectos.

Antibióticos y enzimas líticas. La síntesis de antibióticos es el rasgo de PGPB que se asocia con mayor frecuencia con la capacidad de la bacteria para prevenir la proliferación de patógenos vegetales (generalmente hongos).

Sideróforos. Aparte de la acción directa mencionada anteriormente, la producción de sideróforos puede evitar que algunos fitopatógenos adquieran la cantidad suficiente de hierro como para proliferar (Lugtenberg & Kamilova, 2009), lo que se ha sugerido como un mecanismo eficaz de control de patógenos, ya que los sideróforos bacterianos tienen una afinidad al hierro superior a los fúngicos.

2. OBJETIVOS

Este Trabajo de Fin de Grado aborda la interacción Rizobio-Leguminosa, entre tres especies de leguminosas de la isla de Lanzarote (*Coronilla viminalis*, *Bituminaria bituminosa*, y *Lotus lancerottensis*) y sus respectivos microsimbiontes, con el fin de la restauración del hábitat de los altos de Famara. Nos proponemos como objetivo general la preparación de inoculantes a base de rizobios fijadores de nitrógeno simbiontes específicos para cada leguminosa. Se persigue, además, evaluar otras propiedades promotoras del crecimiento entre los rizobios y endófitos de los nódulos para seleccionar las mejores cepas que, bien inoculadas individualmente o en consorcios rizobios-endófitos, puedan producir el mejor beneficio para las plantas. Los objetivos específicos de este trabajo son:

- I. Estimar la diversidad genética de los rizobios y endófitos que nodulan estas tres leguminosas en suelos de Lanzarote.
- II. Evaluar la capacidad de reinfección de las bacterias aisladas.
- III. Conocer si las bacterias aisladas presentan tres de las principales propiedades promotoras del crecimiento vegetal: producción de ácido indol-3-acético, producción de sideróforos y capacidad de solubilizar fosfatos.
- IV. Valorar el potencial antimicrobiano de un actinomiceto aislado de nódulos radicales.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Bacterias seleccionadas para este estudio.

Las cepas utilizadas para desarrollar este trabajo fueron aisladas en un estudio previo a partir triturados de nódulos radicales de tres especies de leguminosas, *Coronilla viminalis* (coronilla moruna), *Bituminaria bituminosa* (tedera), y *Lotus lancerottensis* (corazoncillo de Lanzarote), crecidas en suelos provenientes de Famara, Lanzarote. De las bacterias recuperadas en cultivo de esos triturados de nódulos, se seleccionaron un total de 36 cepas para este trabajo.

3.2. Medios de cultivo empleados.

A lo largo de este trabajo se han utilizado diferentes medios de cultivo, algunos de ellos para el crecimiento y otros como parte de pruebas de caracterización de las bacterias aisladas. Todos ellos fueron autoclavados a 121 °C durante 20 minutos.

3.2.1. Crecimiento rizobios.

Medio YMA (Yeast-Mannitol Agar): Medio de cultivo estándar empleado para el crecimiento de rizobios (Vincent, 1970). Sus componentes son: KH_2PO_4 0,5 g/L, MgSO_4 0,2 g/L;

NaCl 0,1 g/L; 0,8 g/L de extracto de levadura; 10 g/L de manitol y 15 g de agar en 1 L de agua destilada (dH₂O). En el caso del crecimiento de los aislados para su posterior extracción de ADN, se utilizó el mismo medio sin agar y reduciendo la cantidad de manitol (YM 0,1%). En ambos casos, el pH se ajustó a 6,8-7,0.

3.2.2. Propiedades promotoras del crecimiento.

Medio CAS: Es el medio utilizado para evaluar la producción de sideróforos. Está compuesto por 4 soluciones (para 500 ml de medio). Solución 1: 1,35 mg de FeCl₃·6H₂O en 5 ml de HCl 10mM; 30,25 mg de CAS en 25 ml de dH₂O y 36,4 mg de HDTMA en 20 ml de dH₂O. Solución 2 o tampón: 0,15 g de KH₂PO₄; 0,25 g de NaCl; 0,5 g de NH₄Cl y 15,12 g del reactivo PIPES en 375 ml de dH₂O, ajustar el pH a 6,8 y por último añadir 7,5 g de agar. Solución 3: 1 g de glucosa; 1 g de manitol; 0,246 g de MgSO₄·7H₂O; 276 µl de la solución CaCl₂ (0,02 g/ml); 59 µl de la solución MnSO₄·H₂O (0,01 g/ml); 70 µl de la solución de H₃BO₃ (0,01g/ml), 4 µl de la solución CuSO₄·5H₂O (0,005 g/ml); 8,6 µl de la solución ZnSO₄·7H₂O (0,07 g/ml) y 1 ml de la solución Na₂MoO₄ (0,5 mg/ml) en 35 ml de dH₂O. Solución 4: 1,5 g de casaminoácidos y 0,2 g de extracto de levadura en 15 ml de dH₂O. Las primeras 3 soluciones se autoclavaron a 121°C durante 20 minutos, y la cuarta solución se esterilizó por filtración. Para la preparación del medio, se deja enfriar cada una de las soluciones hasta los 45°C aproximadamente y, a continuación, se vierte la solución 4 sobre la 3. Seguidamente, se añade esta mezcla a la solución 2, y por último se añade la solución 1 hasta obtener un color verde azulado.

Medio Pikovskaya: Medio empleado para estudiar la solubilización de fosfatos insolubles (Pikovskaya, 1948). Composición en g/L es: 10 g Glucosa; 2 g Ca₃(PO₄)₂; 0,5 g (NH₄)SO₄; 0,2 g de NaCl; 0,1 g MgSO₄·7H₂O; 0,2 g KCl; 0,5 g de extracto de levadura; 0,002 g MnSO₄·H₂O; 0,002 g FeSO₄·7H₂O; y 15 g de agar para 1 L de dH₂O. Se ajustó el pH a 6,8.

Medio YM suplementado con triptófano: El medio empleado para el crecimiento rutinario de rizobios (descrito en el apartado anterior) se suplementó posteriormente al autoclavado con 2,5 mM de triptófano, mediante esterilización por filtración para el estudio de la producción de la hormona vegetal ácido indol-3-acético. Se ajustó el pH a 6,8- 7,0.

3.2.3 Pruebas de antibiosis.

Medios TSA (Tryptona Soja Agar) y Müller-Hinton: Estos medios se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante y se utilizaron para el estudio de la capacidad de producción de sustancias antibióticas.

3.3. Experimentos de nodulación.

Para comprobar que las bacterias aisladas de los triturados de los nódulos radicales no son meros endófitos, sino verdaderos rizobios formadores de nódulos y fijadores de nitrógeno, hay que comprobar su capacidad de reinfección de la leguminosa hospedadora original. Para ello, se siguió el protocolo habitual (Howieson & Dilworth, 2016), pero ajustando la escarificación a la naturaleza de nuestras semillas. Las semillas de las tres especies de interés se escarificaron mediante procesos físicos, un escarificado con papel lija para semillas de *Lotus* y de *Coronilla*, o químicos, con ácido sulfúrico, 30 minutos para las semillas de *Bituminaria*. Las semillas se esterilizaron con hipoclorito sódico (lejía comercial al 50%) y se dejaron germinar en oscuridad. Cuando las semillas tenían una radícula de 2-2,5 cm de longitud, se trasplantaron a bandejas de conos con una mezcla de vermiculita y picón (2:1), previamente lavada y esterilizada, y se inocularon con una suspensión de los rizobios crecidos previamente en YMA y resuspendidos en solución salina hasta alcanzar una turbidez de 5 en la escala de McFarland. De estas suspensiones se añaden 1,5 ml a cada semilla. Las plantas se mantuvieron 5 semanas a temperatura ambiente (22-25°C), iluminadas con luz led artificial. Durante las semanas de crecimiento, las plantas se regaron con la solución nutritiva de Rigaud & Puppo (1975) sin fuente de nitrógeno para promover la simbiosis. Después de las 5 semanas, levantamos las plantas e hicimos el recuento de nódulos de cada planta.

3.4. Caracterización filogenética.

3.4.1. Aislamiento de ADN genómico.

El ADN genómico de las cepas seleccionadas se extrajo a partir de cultivos de 5 ml crecidos en medio líquido YM con 0,1% manitol, incubados a 28°C hasta que alcanzaron una turbidez cercana a 1 en la escala de McFarland. El método utilizado fue el kit de extracción "Nucleospin Microbial DNA" siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante.

3.4.2. Condiciones de electroforesis.

Las electroforesis se realizaron en geles de agarosa al 1% con tampón TAE al 1% (2 M Trizma Base, 50 mM EDTA, pH 8) a los que se añadió 1 µl de Midori Green para visualizar posteriormente los ácidos nucleicos. A alícuotas de 5 µl de las extracciones se añadió tampón de carga (0,25 % de azul de bromofenol y 30 % de glicerol) y se cargaron los pocillos del gel. La electroforesis se corrió 20 minutos a 40 V y los 40 minutos a 60 V. Como tampón de cámara se utilizó TAE a la misma concentración. Las imágenes se capturaron bajo luz ultravioleta utilizando

el equipo GelDoc EZ imager (Bio-Rad). La concentración aproximada de DNA genómico en dichos geles se estimó visualmente por comparación con el marcador λ HindIII.

3.4.3. Amplificación por PCR.

La mezcla de reacción para la PCR del gen contenía: 13.875 μ l de H₂O, 5 μ l de 5x Taq Extra Buffer, 1.5 μ l de MgCl₂ (25mM), 0.5 μ l de dNTPMix (10mM), 1 μ l de fD1 (10mM), 1 μ l de rD1 (10mM), 0.125 μ l de 5x Taq Extra DNA polimerasa y 2 μ l de DNA. El volumen final de la mezcla de reacción fue de 25 μ l. El ADNr 16S se amplificó mediante el uso de los siguientes cebadores universales:

fD1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCTCAG-3' y rD1: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

La amplificación se realizó en el termociclador iCycler (Bio-Rad) bajo los siguientes parámetros de ciclado:

95 °C	3 min 30 s	Desnaturalización inicial	} 30 ciclos
94 °C	1 min 10 s	Desnaturalización	
56 °C	40 s	Anillamiento	
72 °C	2 min 10 s	Extensión	
72 °C	6 min 20 s	Extensión final	

3.4.4. Purificación de los amplificadores y análisis de secuencias.

La purificación se realizó con el kit "mi-PCR Purification kit" (Metabion) siguiendo las instrucciones del fabricante y se enviaron a MACROGEN Spain (Madrid) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas se compararon con cepas de referencia utilizando la herramienta BLASTn de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) y la base de datos ezbiocloud (<https://www.ezbiocloud.net/>). Las especies tipo más próximas se descargaron y se usaron para construir la filogenia. Las secuencias se analizaron con el software MEGA X: análisis genético evolutivo molecular en plataformas informáticas (Kumar, Stecher, Li, Knyaz & Tamura 2018). El alineamiento se realizó con la herramienta Clustal W incluida en el MEGA. Los árboles filogenéticos se construyeron con el método Neighbor-Joining (Saitou N. & Nei, 1987) y el parámetro de distancias Kimura-2 (NJ-K2p) (Kimura, 1980).

3.5. Estudio de las propiedades promotoras del crecimiento vegetal.

3.5.1. Producción de sideróforos.

La producción de sideróforos se estudió en placas con el medio CAS. Para ello se preparó una suspensión de cada cepa en solución salina estéril a una densidad óptica de 0,5 unidades McFarland, se añadieron puntos de inoculación de 5 μ l a las placas (3 réplicas por placa) y se

incubaron a 28°C en oscuridad, hasta que se observó un buen crecimiento en el punto de inoculación, tiempo de crecimiento que dependió de la bacteria inoculada. Las cepas productoras de sideróforos se reconocen por un halo de color amarillo alrededor de la zona de crecimiento o “colonia”. Para calcular el índice de producción de sideróforos (Gupta *et al.*, 1994), se empleó la siguiente fórmula $C+Z/C$; donde C hace referencia al diámetro de la colonia y Z al diámetro de la colonia más el diámetro del halo de clarificación alrededor de la colonia. Se establecieron cuatro niveles diferentes en referencia al índice de producción: sin producción ($=1$), baja (<1 y <2), media (≥ 2 y < 3) y alta producción (≥ 3) (Brígido *et al.*, 2017).

3.5.2. Solubilización de fosfatos.

La solubilización de fosfatos se estudió en placas con medio Pikovskaya, al igual que en el caso anterior, se inoculó con una suspensión de la bacteria en solución salina estéril hasta una densidad óptica 0,5 unidades de McFarland, añadiendo puntos de inoculación de 5 μ l a las placas (tres réplicas de cada cepa por placa). Se incubaron a 28°C hasta que se observó buen crecimiento, un tiempo que dependió de la bacteria inoculada. Las cepas solubilizadoras de fosfato mostraron un halo transparente alrededor de la zona de crecimiento o “colonia”. Para calcular el índice de solubilización (SI), se empleó la siguiente fórmula $C+Z/N$ (Gupta *et al.*, 1994), donde C hace referencia al diámetro de la colonia y Z, al diámetro de la colonia más el diámetro del halo de clarificación alrededor de la colonia. Se establecieron tres valores diferentes para la solubilización de fosfatos inorgánicos, donde se consideró: sin solubilización ($=1$), baja (entre >1 y <2), y alta solubilización (≥ 2) (Brígido *et al.*, 2017).

3.5.3. Producción de ácido indol-3-acético.

Para la evaluación de esta hormona vegetal se llevó a cabo el método colorimétrico de Gordon-Weber (Gordon & Weber, 1951). Se prepararon inóculos a una densidad óptica 0,5 unidades McFarland en tubos de ensayo con 5 ml de medio YM suplementado con triptófano 2,5 mM y se incubaron en agitación a 28°C hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente, debido a la diferente velocidad de crecimiento de las cepas, se midió su absorbancia a 600 nm (en el lector de placa Tecan Infinite M200 Plate Reader) para verificar que tenían una turbidez similar y óptima para el ensayo (alrededor de 0,5 unidades de absorbancia). Una vez crecidas, se pasó 1,5 ml del cultivo a tubos Eppendorf estériles y se centrifugaron durante 5 minutos a 8000 rpm. A continuación, se retiró 200 μ l del sobrenadante, se transfirieron a nuevos Eppendorf estériles, se añadió 600 μ l del reactivo Salkowski (3,465 g $Cl_3Fe \cdot 6H_2O$; 300 ml dH_2O ;

100 ml H₂SO₄) y se incubaron 30 minutos en oscuridad, para posteriormente leer su absorbancia en la placa multiwell a 540 nm. Por último, la producción de indolacético se estimó a partir de los datos de absorbancia de la recta patrón con concentraciones (µg/ml) conocidas de IAA. Se consideraron cuatro niveles para clasificar los aislados en función del nivel de fitohormona producido siguiendo el criterio de Brígido *et al.*, 2017; baja producción (<15 µg/ml), media (entre 30 y 45 µg/ml) y producción muy alta (>45 µg/ml).

3.6. Antibiosis.

En este ensayo se estudió la capacidad de producción de sustancias antibióticas de un actinomiceto aislado como endófito de los nódulos radicales de *C. viminalis* (En- CVIF4) que posteriormente clasificamos como perteneciente al género *Streptomyces*.

Para los ensayos de antibiosis, primero se sembraron placas por agotamiento de cuatro cepas de bacterias, dos Gram negativas y dos Gram positivas, que sirvieron como “microorganismos indicadores”. De la colección del área de Microbiología *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y cedidas por el profesor E. Pérez Roth *Staphylococcus aureus* (cepa resistente a meticilina, aislado HUNSC485), y *Klebsiella pneumoniae* (cepa multirresistente, aislado CRKP155038). Se dejaron crecer 24 horas a 37°C, para comprobar la pureza y disponer de cultivos frescos de las bacterias. Posteriormente se inocularon en caldo nutritivo y se incubaron de nuevo en las mismas condiciones y en agitación. Cuando los cultivos tenían una turbidez alta, se diluyeron hasta alcanzar una turbidez aproximada a 0,5 unidades McFarland. De este inóculo se sembraron 100 µl en placas de TSA y Müller-Hinton, extendiendo con un hisopo estéril hasta formar un césped homogéneo a lo largo de toda la placa. Por último, con la parte trasera de una punta de pipeta estéril de 200 µl, se recortó una fracción circular del agar (simulando un disco antibiótico) de una placa donde había crecido previamente el actinomiceto, se colocó en el centro de cada placa ya sembrada con las bacterias indicadoras y se incubó 24 horas a 37°C. Un resultado positivo se observó como un halo de inhibición del crecimiento de las bacterias seleccionadas alrededor del disco.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Bacterias utilizadas en este trabajo.

Para este trabajo se seleccionaron 36 cepas aisladas de nódulos radicales de las tres leguminosas objeto de estudio. Estas cepas fueron aisladas en un trabajo previo, siguiendo el protocolo de aislamiento de rizobios con el sistema de plantas trampas (Howieson & Dilworth,

2016), que consiste en plantar semillas estériles de la leguminosa de interés y dejarlas crecer en suelos de la zona, en este caso suelos recolectados en Famara, Lanzarote, de manera que sus raíces atrapan en los nódulos a los rizobios compatibles para cada leguminosa. Después de seis semanas, se recolectaron los nódulos, se esterilizaron en superficie, se trituraron y se sembraron en placas de YMA. De manera inesperada, la mayoría de los triturados de *C. viminalis* y *B. bituminosa*, no produjeron ningún crecimiento sobre las placas con medio YMA, o se producía un escaso crecimiento con unas pocas colonias principalmente en la zona de descarga inicial. Estos fracasos para recuperar los rizobios resultaban sorprendentes, puesto que las plantas trampas presentaban buen aspecto y nódulos con aspecto funcional, sugiriendo la presencia de rizobios fijadores. Cuando se desarrollaron colonias, se aislaron, se purificaron por sucesivos pases en placas Petri con medio YMA y se conservaron en crioviales a -80°C con 20% de glicerol (v/v).

Las cepas aisladas han sido nombradas dependiendo de la leguminosa original, "CVIF" para las cepas de *C. viminalis*, "BBIF" para las de *B. bituminosa* y "LLAF" para *L. lancerottensis*, añadiendo un número y letra para distinguir entre cepas. Para *Coronilla* y *Bituminaria*, los aislamientos con plantas trampas se realizaron en dos ocasiones (experimento 1 y 2 de la Tabla 1) y las cepas aisladas en el segundo experimento se distinguieron añadiendo delante de CVI o BBI el prefijo IS (del inglés "ISolate").

4.2. Ensayos de reinfección en las leguminosas hospedadoras.

La metodología habitual de trabajo con rizobios exige comprobar que las bacterias aisladas de los triturados de nódulos son verdaderos rizobios, comprobando su capacidad para reinfestar las raíces de las leguminosas hospedadoras originales, y producir nódulos radicales fijadores de nitrógeno. Las bacterias aisladas de los triturados de nódulos no habían sido aún confirmadas como verdaderos rizobios, aunque hay que destacar que las plantas trampas presentaban buen aspecto, en tamaño y verdor, y que los nódulos tenían un aspecto funcional, es decir, color rojo-rosado (debido a la presencia de leghemoglobina), lo que hacía presumir la presencia de rizobios eficaces en el interior de los nódulos. Puesto que en el trabajo previo no se habían realizado ensayos de reinfección, fue necesario hacerlo en este TFG. Para realizar estos ensayos de reinfección, de cada planta se seleccionaron aquellas cepas que por la morfología de sus colonias podrían considerarse rizobios.

Sin embargo, como veremos, los resultados mostraron que sorprendentemente, la mayoría de las bacterias aisladas no fueron capaces de formar nódulos (Tabla 1) y

posteriormente, cuando se identificaron por sus secuencias, se confirmó que no se trataba de rizobios.

Tabla 1. Capacidad de los aislados de nódulos radicales de *Coronilla viminalis*, *Bituminaria bituminosa* y *Lotus lancerottensis* para reinfectar las leguminosas hospedadoras originales.

Experimento 1		Experimento 1		Experimento 2	
Cepas	Nódulos/planta	Cepas	Nódulos/planta	Cepas	Nódulos/planta
<i>Coronilla viminalis</i>					
CVIF1	0	CVIF2A	0	ISCV18	8,8
CVF2A	0	CVIF2C	0	ISCV19	4 (NNF)
CVIF2B	0	CVIF4C	0		
CVIF4	0	CVIF5A	0		
CVIF8	0	CVIF5B	0		
<i>Bituminaria bituminosa</i>					
BBIF1	0			ISBB11	0,3
BBIF2	1-4			ISBB3A	7,9
BBIF3A	0			ISBB13B	8,6
BBIF3B	0			ISBB14	7
BBIF3C	2 (NNF)			ISBB15	5,7
BBIF8	0			ISBB16	8,2
BBL17	4,4			ISBB17	7,3
<i>Lotus lancerottensis</i>					
LLAF1	14				
LLAF2A	15				
LLAF2B	11				

NNF: nódulo no funcional

En el caso de *Coronilla viminalis*, se seleccionaron inicialmente cinco cepas del experimento 1 (aisladas del primer lote de plantas-trampas) y ninguna noduló (Tabla 1). Se ensayó entonces la nodulación con otras 5 cepas obtenidas del mismo experimento 1, e igualmente no se obtuvo nodulación con ninguna.

En el caso de las bacterias de *Bituminaria bituminosa*, de las seis cepas seleccionadas del experimento 1, sólo fueron capaces de reinfectar la tедера BBIF2, que produjo plantas con escaso número de nódulos, de 1 a 4 por planta, y de aspecto poco eficaces, y la cepa BBIF3C que produjo nódulos ineficaces. Como control positivo se probó la nodulación con BBL17, una cepa aislada de suelos de Haría (Lanzarote) en un estudio previo, que ya sabíamos que nodulaba eficazmente la tедера, y que se confirmó con una media de 4,4 nódulos por planta, de aspecto funcional.

En el caso de *Lotus lancerottensis* se seleccionaron solo 3 cepas para los ensayos de infectividad, ya que los triturados de los nódulos produjeron abundante crecimiento con colonias de morfología compatible con la especie *Sinorhizobium meliloti*, que ha sido mostrada

como el microsimbionte habitual de *Lotus lancerottensis* (León-Barrios *et al.*, 2009, 2017). Como esperábamos, las 3 cepas seleccionadas nodularon muy bien, entre 11 y 15 nódulos por planta, y presentaban color rojo indicando su funcionalidad para fijar nitrógeno, cualquiera de estas tres podría usarse como inoculante.

Los fracasos que obtuvimos de nodulación en *C. viminalis* y *B. bituminosa* indicaban que la mayoría de cepas recuperadas de los triturados eran endófitos presentes dentro de los nódulos, y no habíamos sido capaces de recuperar los rizobios. Estos resultados parecen coincidir con datos previos de algunos autores, que han señalado la dificultad para recuperar en los medios de laboratorio los rizobios provenientes de triturados de nódulos radicales de ciertas leguminosas silvestres, señalando que parece un fenómeno frecuente la existencia de rizobios no cultivables dentro de los nódulos de algunas leguminosas (Muresu *et al.*, 2008, 2019).

Dado que el número de nódulos fue nulo o bajo, y poco eficaces para los aislados seleccionados de este primer experimento, se realizó otro ensayo de nodulación usando cepas que habían sido aisladas de un segundo lote de plantas trampas (experimento 2), con suelo de una zona cercana y procurando una mayor cercanía a las raíces (ya que estas plantas no pueden ser arrancadas debido al escaso número de individuos de las poblaciones de estas leguminosas en suelos de Famara). Aunque de nuevo muchos triturados de este experimento 2 no produjeron crecimiento o crecieron colonias no compatibles con rizobios, en algunas si se obtuvieron colonias compatibles con rizobios de crecimiento muy lento (son necesarias 2-3 semanas para que haya colonias bien visibles). Las cepas seleccionadas y ensayadas para nodulación de este experimento 2, se recogen también en la Tabla 1.

Para *C. viminalis*, las dos cepas aisladas, ISCVI8 y ISCVI9, produjeron nódulos. En el caso de ISCVI9, por el aspecto clorótico de las plantas y la coloración blanca de los nódulos, se deduce que es ineficaz, pero las plantas inoculadas con ISCVI8 presentaron buen aspecto en tamaño y verdor, indicando, su buena capacidad para fijar nitrógeno. En *B. bituminosa*, las inoculaciones con 6 de las 7 cepas ensayadas produjeron plantas con un buen número de nódulos funcionales. A pesar de que ISBBI6 presentó la segunda media más alta de nódulos por planta, éstos eran muy pequeños y las plantas no tenían buen aspecto. En cuanto a tamaño, color y aspecto de los nódulos, las mejores cepas fueron ISBBI7, seguidas de ISBBI3B e ISBBI4.

Finalmente, basándonos en los datos de nodulación, se ha seleccionado la cepa ISCVI8 de *Coronilla viminalis*, y la cepa ISBBI7 de *Bituminaria bituminosa* para las inoculaciones en el programa de restauración de la vegetación en los altos de Famara. Desafortunadamente, no hubo tiempo para identificar estas bacterias aisladas en el segundo experimento, y con alguna excepción no crecieron en los medios para evaluar la promoción del crecimiento. En el caso de *Lotus*, cualquiera de las tres cepas ensayadas son buenas candidatas para preparar un inoculante.

4.3. Identificación de los aislados: Análisis filogenético.

Las secuencias del gen del 16S ARNr para estudiar la filogenia y la taxonomía bacteriana es el marcador genético más común utilizado por varias razones: Por su presencia universal en todos los seres vivos, por su alto grado de conservación, y porque es un gen de tamaño lo suficientemente grande y contiene suficiente información para construir una filogenia fiable (Janda & Abbott, 2007). Por ello, en este trabajo se utilizó el gen 16S como aproximación a la identificación de los aislados.

De las 36 cepas utilizadas en este trabajo, en el árbol filogenético (Fig.2) se muestra la filogenia de 22 cepas. Otras 5, no se incluyeron en el árbol porque sólo obtuvieron secuencias cortas (en la Tabla 2 con un asterisco), pero que permitieron identificar el género o las especies más próximas, y el resto no dio tiempo a identificarlas u obtuvimos secuencias de muy mala calidad. Estos análisis demostraron que la mayoría de las cepas son Gram negativas de la Clase Alfarproteobacteria, pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Sinorhizobium* (*Ensifer*), *Mesorhizobium*, *Shingomonas* y *Shinella*. La cepa BBIF8 es una Betaproteobacteria del género *Pseudoduganella* y dos cepas (CVIF5A y CVIF2A) son Gammaproteobacteria del género *Pseudomonas*.

Sólo 3 cepas fueron bacterias Gram positivas. Las cepas EnCVIF3 y BBIF3A son Firmicutes de los géneros *Peribacillus* y *Pseudoarthrobacter*, respectivamente, y En-CVIF4 es una Actinobacteria del género *Streptomyces*. De todos estos aislados, sólo nodularon las cepas de *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* (Tabla 1), y las demás han de ser consideradas endófitos que habitan en los nódulos radicales. Es necesario decir, que por necesidades de tiempo los ensayos de nodulación e identificación se hicieron simultáneamente, de manera que no sabíamos la taxonomía de los aislados en el momento de realizar los experimentos de reinfección.

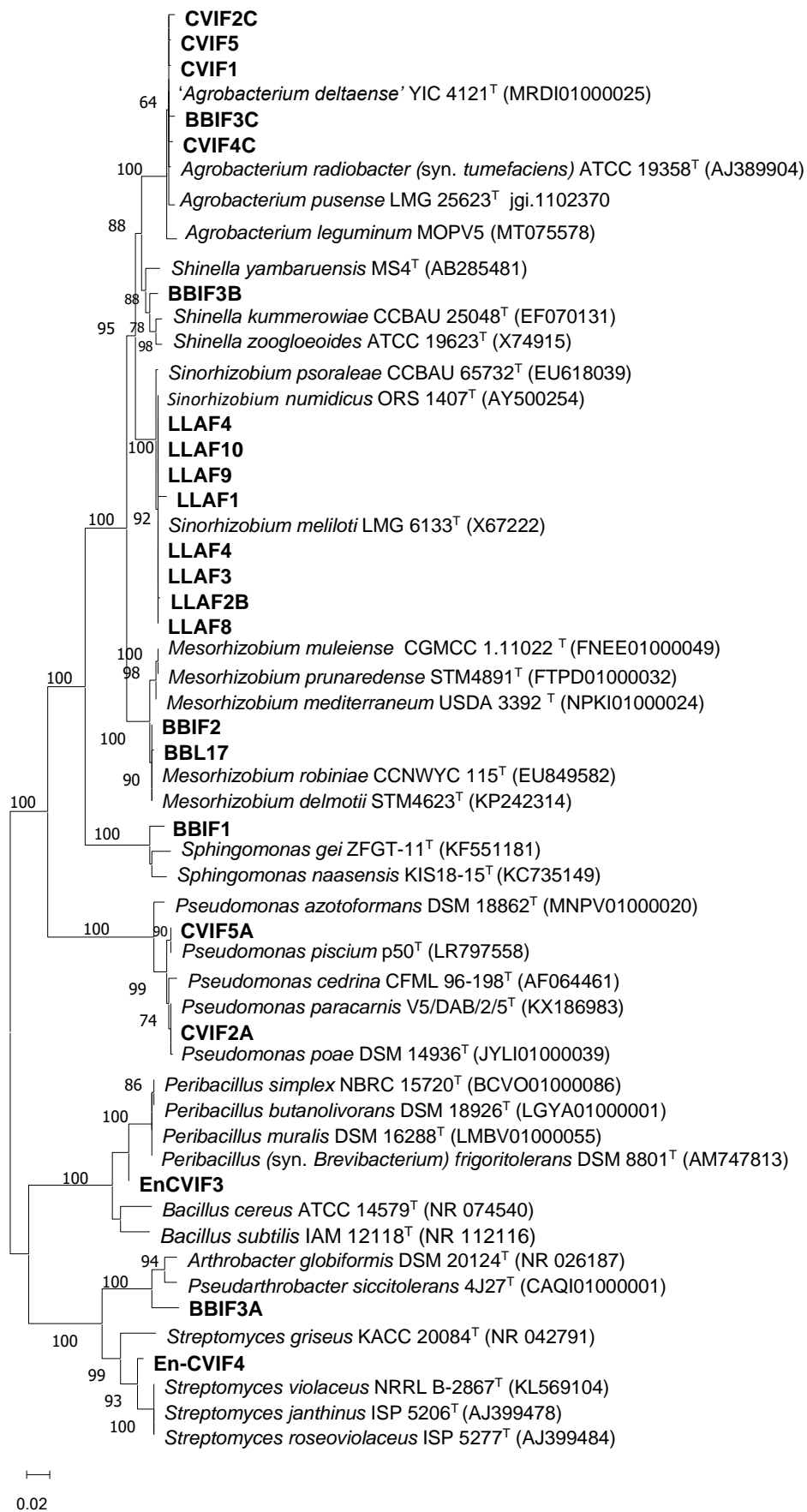


Fig. 2 Árbol filogenético construido con Neighbor-joining kp2, basado en las secuencias del ARN ribosómico 16S (1294 nt) de los aislados de nódulos radicales de *C. viminalis*, *B. bituminosa* y *L. lancerottensis*, y las especies referencia más próximas, tomadas del NCBI. Los números de los nodos representan el porcentaje de apoyo de las ramas mediante el método "bootstrap" con 1000 réplicas.

Todos los aislados de *Lotus lancerottensis* nodularon (Tabla 1) y se agruparon con la especie *Sinorhizobium meliloti* (Fig.2), un hecho que concuerda con previos hallazgos de nuestro grupo (León-Barrios *et al.*, 2009, 2017). También produjeron nodulación en los ensayos de reinfección, dos cepas aisladas de tедера, BBL17 y BBIF2 (Tabla 1), las dos pertenecientes al género *Mesorhizobium*, con varias especies en una rama que no es resuelta en la filogenia del 16S (Fig. 2).

Sin embargo, como se comentó, el resto de las cepas aisladas no fueron capaces de reinfectar y formar nódulos en su leguminosa hospedadora, aunque muchas de ellas sí están relacionadas con bacterias aisladas de rizosfera o con endófitos de nódulos, o incluso son géneros que contienen alguna especie capaz de nodular.

La cepa BBIF3B se agrupa con *Shinella*, un género que se ha relacionado muchas veces con la rizosfera y como endófito de nódulos, incluso se ha descrito la especie *S. kummerowiae* como un verdadero rizobio, ya que forma nódulos fijadores de nitrógeno en *Kummerowia stipulacea* (Lin *et al.*, 2008). Nuestra cepa no produjo nódulos.

Uno de los grupos más numerosos entre nuestros endófitos es *Agrobacterium*, un hecho que coincide con resultados previos de varios grupos, ya que probablemente es el género que con mayor frecuencia se aísla como endófito de nódulos radicales (de Lajudie *et al.*, 1999; Lorite *et al.*, 2010; Murugesan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2006). En nuestro caso, 5 cepas aisladas de *C. viminalis* (CVIF1, CVIF2C, CVIF4C, CVIF5) y 1 de *B. bituminosa* (BBIF3C) son *Agrobacterium* y tienen gran similitud (99,25-99,7%) con la especie descrita como '*A. deltaense*' que, si bien aún no ha sido formalmente validada, fue aislada como endófito de nódulos de *Sesbania cannabina* (Yan *et al.*, 2017). Por otro lado, nuestras bacterias también están estrechamente relacionadas con *A. radiobacter*, con la que comparten entre 99,25-99,4% de similitud, especie que es habitante común de los nódulos en leguminosas (Martínez-Hidalgo & Hirsch, 2017). A pesar de que *Agrobacterium* es habitualmente un endófito no nodulante, hay al menos una excepción, dos cepas, YIC 5082^T e YIC4104, descritas como *A. salinitolerans* forman nódulos efectivos en *Sesbania cannabina* (Yang *et al.*, 2017).

BBIF1, un endófito no nodulante de tедера, es una bacteria próxima a dos especies de *Shingomonas* aisladas de rizosfera de plantas (Kim *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2015).

En cuanto al género *Pseudomonas*, se clasificaron dos aislados de *C. viminalis*, CVIF5A y CVF2A, próximas a especies *P. paracarnis* y *P. piscium*, aisladas de diferentes ambientes, pero en ninguno de los dos casos relacionados con rizosfera de plantas.

Por último, ninguna de las tres bacterias Gram positivas, EnCVIF3, En-CVIF4 y BBIF3A noduló, como era de esperar. EnCVIF3 pertenece *Peribacillus*, un género de reciente creación segregado de *Bacillus* (Patel & Gupta, 2020) y comparte un 100% de similitud con la especie *P. frigoritolerans*, una especie tolerante al frío, lo cual resulta curioso dado que EnCVIF3 fue aislada de suelos de Lanzarote. La cepa En-CVIF4, la habíamos clasificado como un actinomiceto debido a su morfología en las placas de laboratorio y se confirma con la secuenciación que pertenece al género *Streptomyces*, muy próximo (99,71% de similitud) a la especie *S. violaceus*, con quien además comparte la característica de producir un pigmento violeta. Por último, BBIF3A, es una Actinobacteria no filamentosa con relaciones filogenéticas estrechas con *Pseudarthrobacter* (antes *Arthrobacter*) *siccitolerans* (98,59%), una especie altamente tolerante a la desecación, aislada de la rizosfera de una planta en un suelo seco (SantaCruz-Calvo *et al.*, 2013), lo que en este caso guarda relación con el ambiente seco del que también fue aislada BBIF3A.

Algunas no fueron incluidas en el árbol por la mala calidad de sus secuencias, pero a partir de un fragmento, sabemos que BBIF8 tiene alta similitud (99,8%) con la especie *Pseudoduganella violaceinigra* YIM 31327, una bacteria aislada de la superficie de hojas de *Trifolium repens* (Kämpfer *et al.*, 2012). Por otra parte, la corta secuencia de CVIF4 y CVIF8 las incluye dentro del clado de *Agrobacterium*.

La diversidad de los rizobios de *C. viminalis* no se ha estudiado nunca, y los únicos estudios de este género pertenecen a un trabajo de la especie *C. varia* en los suelos de China (Yang *et al.*, 2013), donde se caracterizaron noventa rizobios simbióticos que se identificaron como *M. alhagi*, *M. amorphae*, *M. metallidurans*/*M. gobiense* como grupo dominante (86,7%) y *Rhizobium yanglingense* y *Agrobacterium tumefaciens* como grupos minoritarios. En nuestro caso, las dos únicas cepas nodulantes de *C. viminalis* no se pudieron identificar en este trabajo por falta de tiempo, pero su lento crecimiento nos hace presuponer que podrían tratarse de cepas de *M. alhagi*, ya que esta especie ha sido detectada en suelos de Lanzarote (León-Barrios *et al.*, 2017). También son escasas las caracterizaciones de rizobios de *B. bituminosa*, pero algunos trabajos previos indican que especies de *Mesorhizobium* junto con *Sinorhizobium* son dos microsimbiontes principales (Rejili *et al.*, 2020).

4.4. Estudio de las bacterias promotoras del crecimiento.

De las 36 cepas seleccionadas para los ensayos de las propiedades promotoras del crecimiento, 12 se aislaron de *C. viminalis*, 14 de *B. bituminosa* y 10 de *L. lancerottensis*. Varias

cepas no fueron capaces de crecer en los medios de ensayo de solubilización fosfato y producción hierro, por eso, en la Tabla 2 solo se muestran las cepas que crecieron en los medios CAS y/ o Pikovskaya.

Tabla 2. Resultados para las cepas que crecieron y dieron actividad en la producción de sideróforos y en la solubilización de fosfato tricálcico en las bacterias aisladas de nódulos de *Coronilla viminalis*, *Bituminaria bituminosa* y *Lotus lancerottensis*.

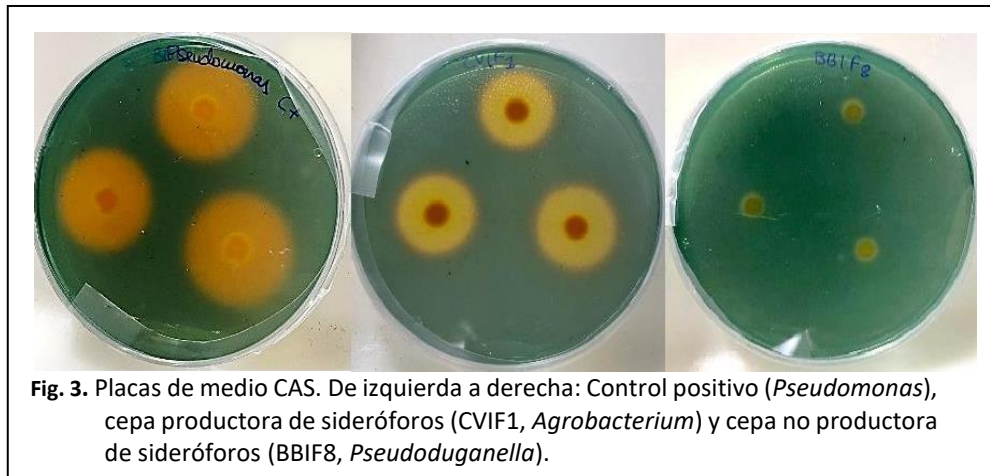
CEPAS	Especie más próxima	Producción de sideróforos		Solubilización de fosfato	
		Halo (cm)	Eficacia	Halo (cm)	Eficacia
<i>Coronilla viminalis</i>					
CVIF1	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	3,56	Alto	1	No
CVIF2A	<i>Pseudomonas paracarnis</i>	3,39	Alto	2,86	Alto
CVIF2B	<i>Shinella sp.</i>	1	No	1	No
CVIF2C	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	2,81	Medio	1	No
CVIF4	<i>Agrobacterium radiobacter*</i>	2,96	Medio	1	No
CVIF4C	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	3,31	Alto	1	No
CVIF5	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	3	Alto	1	No
CVIF5A	<i>Pseudomonas piscium</i>	3,37	Alto	3,29	Alto
CVIF8	<i>Agrobacterium radiobacter*</i>	3,04	Alto	1	No
En-CVIF4	<i>Streptomyces sp.</i>	3,39	Alto	1	No
<i>Bituminaria bituminosa</i>					
BBIF1	<i>Sphingomonas naasensis</i>	sc	sc	1	No
BBIF3A	<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	sc	sc	1	No
BBIF3B	<i>Shinella sp.</i>	1	No	sc	sc
BBIF3C	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	2,92	Medio	1	No
BBIF8	<i>Pseudoduganella sp. *</i>	1	No	2,52	Alto
BBL17	<i>Mesorhizobium sp.</i>	sc	sc	1	No
ISBBIF1	nd	sc	sc	2,88	Alto
<i>Lotus lancerottensis</i>					
LLAIF1	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	2,17	Medio	1	No
LLAIF2A	<i>Sinorhizobium meliloti *</i>	3,06	Alto	2,55	Alto
LLAIF2B	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	2,52	Medio	1	No
LLAIF3	nd	2,27	Medio	2,88	Alto
LLAIF7	<i>Sinorhizobium meliloti *</i>	3,39	Alto	2,47	Alto
LLAIF8	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	2,94	Medio	2,71	Alto
LLAIF9	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	3,41	Alto	2,27	Alto
LLAIF10	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	2,94	Medio	3,2	Alto
C+ Sideróforos	<i>P. fluorescens</i>	4,30	Alto	-	-
C+ Fosfato	<i>M. ciceri</i> CCANP14	-	-	3,59	Alto

*Secuencias cortas y/o de mala calidad (no se pudieron incluir en el árbol, pero en algunos casos el fragmento permitió la identificación del género o de la especie más próxima; **nd**: no identificadas taxonómicamente; **sc**: no hubo crecimiento de las colonias.

4.4.1. Producción de sideróforos.

De las 36 cepas, 15 no fueron capaces de crecer en el medio CAS. De las 21 cepas que crecieron, 18 produjeron sideróforos (Tabla 2). La producción de sideróforos se reconoce fácilmente por la formación de un halo de color amarillo alrededor de la colonia, más o menos extenso según sea la actividad que presenten (Fig. 3).

Como control positivo se utilizó una cepa con alta producción de sideróforos de la especie *Pseudomonas fluorescens* aislada en nuestro laboratorio (Fig. 3). Entre nuestros aislados, las cepas con mayor producción de sideróforos son las de *Coronilla viminalis*, con 7 de alta producción, 5 de ellas pertenecientes al género *Agrobacterium* y 2 a *Pseudomonas*. En *Bituminaria bituminosa* la mayoría de las cepas no crecieron en este medio y solo se produjo crecimiento con alta producción en BBIF3C, tratándose de nuevo de un *Agrobacterium*. Nuestros resultados están en concordancia con estudios previos que señalan a *Agrobacterium* como un buen productor de sideróforos (Rondon *et al.*, 2004). Por último, también hay que resaltar los resultados de *S. meliloti*, aislados de *Lotus lancerottensis*, con una producción media o alta de sideróforos.

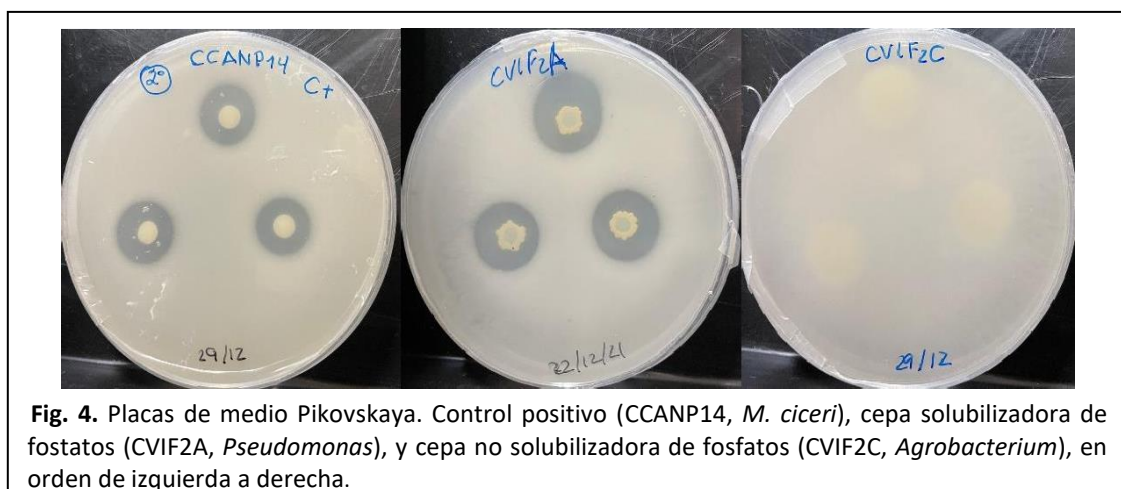


4.4.2. Solubilización de fosfatos.

De las 36 cepas, 12 no crecieron sobre medio Pikovskaya. De las 24 que crecieron, solubilizaron fosfatos 11 (Tabla 2). Las solubilizadoras de fosfatos formaron un halo transparente a su alrededor (Fig. 4). Como control positivo utilizamos *Mesorhizobium ciceri* (CCANP14) (Menéndez *et al.*, 2020) (Fig. 4). En el caso de *C. viminalis*, solo dos cepas, CVIF2A y CVIF5, las dos pertenecientes al género *Pseudomonas*, mostraron un índice de solubilización alto, además, es importante destacar que estas dos cepas también mostraron alta producción

de sideróforos. De las cepas de *B. bituminosa* ensayadas, sólo dos de ellas, BBIF8 (*Pseudoduganella*) y ISBBIF1 (no identificada), presentaron niveles altos de solubilización. Las cepas *S. meliloti* de *L. lancerottensis*, dieron los mejores resultados en esta propiedad, 6 de las 8 cepas ensayadas dieron un resultado positivo y con alta solubilización. De ellas, LLAIF2A, LLAIF7, LLAIF9, además de presentar un alto índice de solubilización de fosfato, también tienen alta producción de sideróforos.

Estos resultados concuerdan con estudios previos donde se muestra que *Pseudomonas* y *Sinorhizobium* están entre los principales géneros solubilizadores de fosfato (Rodríguez & Fraga 1999; Fernández *et al.* 2007).



4.4.3. Producción de ácido indol-3-acético.

Las concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de ácido indolacético producidas por nuestras cepas se muestran en Fig. 5, 6 y 7.

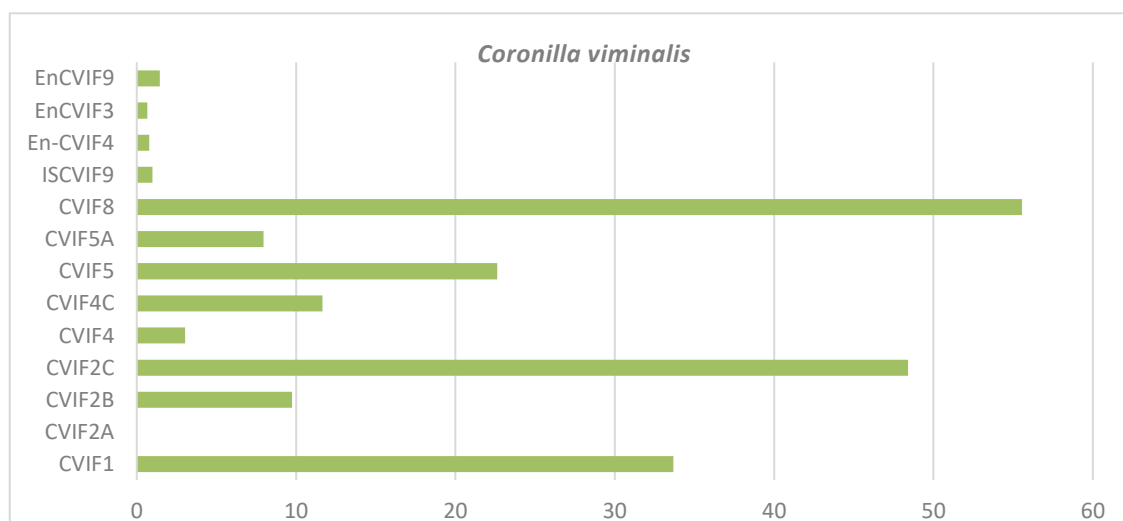


Fig.5 Resultados obtenidos en la producción de IAA ($\mu\text{g/ml}$) en cepas aisladas de la rizosfera de *Coronilla viminalis*.

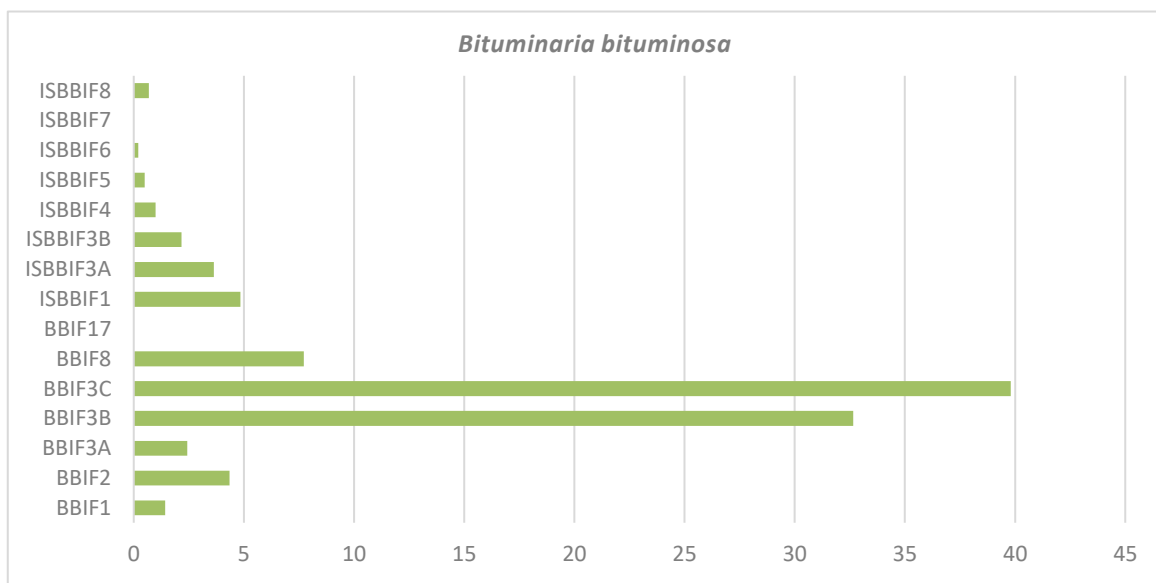


Fig.6 Resultados obtenidos en la producción de IAA ($\mu\text{g/ml}$) en cepas aisladas de la rizosfera de *Bituminaria bituminosa*.

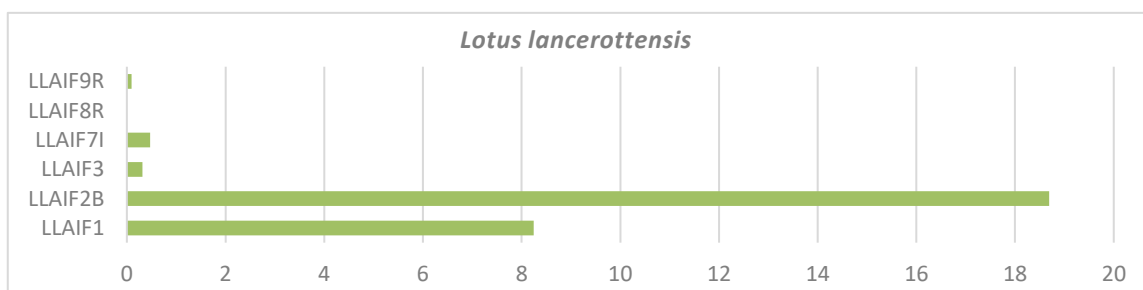


Fig.7 Resultados obtenidos en la producción de IAA ($\mu\text{g/ml}$) en cepas aisladas de la rizosfera de *Lotus lancerottensis*.

En este ensayo, solo hemos utilizado 34 cepas, 30 de ellas son productoras de IAA, aunque la mayoría en concentraciones bajas. Únicamente cabe destacar dos cepas de *Agrobacterium* aisladas de *Coronilla*, CVIF2C y CVIF8 (Fig. 5), que tienen una producción muy alta ($>45 \mu\text{g/ml}$). En tederá destacan las cepas BBIF3B y BBIF3C (Fig. 6), con una producción media de IAA ($30\text{-}45 \mu\text{g/ml}$), de los géneros *Shinella* y *Agrobacterium*. Por último, todos los microsimbiontes de *Lotus lancerottensis* (Fig. 7) presentan baja actividad.

En resumen, en cuanto a las propiedades promotoras del crecimiento vegetal ensayadas en este TFG, podemos concluir que los mejores productores de sideróforos son los endófitos de *C. viminalis* y de *L. lancerottensis*. Estos últimos, además, con buenos resultados en la solubilización de fosfato y por el aspecto de las plantas, buenos fijadores de nitrógeno, por lo que los podemos considerar excelentes inoculantes para *L. lancerottensis*.

Entre los endófitos de *C. viminalis* es interesante destacar que las pertenecientes al género *Pseudomonas*, CVIF2A y CVIF5A, presentan también simultáneamente alta eficacia en

solubilización de fosfatos y producción de sideróforos, serían buenas candidatas para usar en co-inoculaciones con el rizobio nodulante. Resultados de otros autores han reportado el efecto positivo de *Pseudomonas* sobre las plantas gracias a estas propiedades (Guiñazú *et al.*, 2010). En cuanto a la producción de IAA, desafortunadamente las mejores cepas productoras no son buenas solubilizadoras de fosfato, ni producen sideróforos. Las mejores productoras de auxinas se encontraron entre los aislados de *Agrobacterium*, que en general es el género más eficiente en cuanto a PGPB. Una propuesta razonable para tener los mejores beneficios para nuestras leguminosas sería usar co-inóculos combinando el mejor rizobio fijador con alguna de estas cepas de *Agrobacterium*, una vez confirmado que no tienen potencial patogénico, algo que no esperamos si tenemos en cuenta el aspecto ‘saludable’ que presentaban las plantas trampas de la que fueron aislados. Esta estrategia de usar co-inoculaciones sería posiblemente la mejor opción para conseguir el éxito de las repoblaciones con fines de restaurar el hábitat de Famara.

4.5. Antibiosis.

Para este ensayo se seleccionó una cepa de un actinomiceto aislado de un nódulo de coronilla, En-CVIF4, que clasificamos como una especie perteneciente o próxima al género *Streptomyces*. Los resultados de los ensayos de antibiosis se muestran en la Tabla 3. Como puede observarse, ninguna de las dos especies de bacterias Gram negativas usadas mostró sensibilidad frente al actinomiceto. Por el contrario, los ensayos con *Staphylococcus aureus* mostraron halos de inhibición alrededor del taco del actinomiceto. De *S. aureus* se usaron dos cepas, una de ellas resistente a meticilina, ambas mostraron halos de tamaños similares, de 1,8 y 1,5 cm respectivamente. Es importante señalar que los ensayos se hicieron, no con extractos, sino con un taco de un cultivo del actinomiceto, y que el diámetro del halo producido no es equiparable a los establecidos en tablas de referencia realizadas con concentraciones conocidas de sustancias antibióticas purificadas, por tanto, no podemos establecer un resultado de sensibilidad o resistencia de *S. aureus*. Sin embargo, es interesante que tanto la cepa de colección como la resistente a meticilina, presentan sensibilidad al/los producto/s producidos por el actinomiceto En-CVIF4.

Tabla 3. Resultados obtenidos en los ensayos de antibiosis.

Cepas	Interacción	Diámetro del halo (cm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sensible	1,8
<i>Escherichia coli</i>	Resistente	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (resistente a meticilina)	Sensible	1,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> multirresistente	Resistente	0

5. CONCLUSIONES

- 1.- Nuestros resultados pusieron de manifiesto la dificultad en el laboratorio para recuperar en medios de cultivo los rizobios a partir de nódulos radicales de *C. viminalis* y *B. bituminosa* silvestres, sugiriendo que están ocupados por rizobios 'fastidiosos' o no cultivables.
- 2.- Los rizobios que nodulan *L. lancerottensis* en los suelos de Lanzarote son fácilmente recuperables en los medios de laboratorio y pertenecen mayoritariamente a la especie *Sinorhizobium meliloti*, coincidiendo con estudios previos.
- 3.- De los nódulos radicales de *C. viminalis* y *B. bituminosa* se aislaron una gran diversidad de bacterias que no fueron capaces de reinfectar y formar nódulos en su leguminosa hospedadora, por lo cual deben considerarse bacterias endófitas que co-habitan junto con rizobios.
- 4.- Muchos de los endófitos aislados en este trabajo son bacterias relacionadas filogenéticamente con otros endófitos de nódulos, o con bacterias rizosféricas, y presentan *in vitro* propiedades promotoras del crecimiento vegetal, sugiriendo un beneficio para la planta.
- 5.- El uso de co-inoculantes que combinen un rizobio fijador de nitrógeno con algunas de las bacterias endófitas que han mostrado combinar varias propiedades promotoras del crecimiento vegetal, sería una buena opción para conseguir el mejor éxito de las repoblaciones en la restauración del hábitat de Famara.

CONCLUSIONS

- 1.- Our results highlighted the difficulty in the laboratory to recover rhizobia in culture media from root nodules of wild *C. viminalis* and *B. bituminosa*, suggesting that they are occupied by 'fastidious' or unculturable rhizobia.
- 2.- The rhizobia that nodulate *L. lancerottensis* in soils of Lanzarote are easily recoverable in laboratory media, and belong mainly to the species *Sinorhizobium meliloti*, coinciding with previous studies.
- 3.- From the root nodules of *C. viminalis* and *B. bituminosa*, a great diversity of bacteria were isolated that were not able to reinfect and form nodules on their host legume, so they should be considered as endophytic bacteria that co-inhabit together with rhizobia.
- 4.- Many of the endophytes isolated in this work are phylogenetically related to other nodule endophytes, or to rhizospheric bacteria, and exhibit *in vitro* plant growth promoting properties, suggesting a benefit to the plant.
- 5.- The use of co-inoculants that combine a nitrogen-fixing rhizobia with some of the endophytic bacteria that have been shown to combine several plant growth promoting properties, would be a good option to achieve the best success of reforestations in the restoration of the Famara habitat.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, A., & Hasnain, S. (2010). Auxin-producing *Bacillus* sp.: Auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. *Pure Appl. Chem.*, *82*, 313–319.
- Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J., & Bakker, P. A. H. M. (2012). The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.*, *17*, 478–486.
- Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S., & Lebeau, T. (2009). Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere*, *74*, 280–286.
- Brígido, C., Glick, B. R., & Oliveira, S. (2017). Survey of Plant Growth-Promoting Mechanisms in Native Portuguese Chickpea *Mesorhizobium* Isolates. *Microbiol. Ecol.*, *73*, 900–915.
- Brockwell, J., P. J. Bottomley, and J. E. Thies. 1995. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. *Plant Soil* *174*:143–180.
- Bulot, A., Provost, E., & Dutoit, T. (2014). A comparison of different soil transfer strategies for restoring a Mediterranean steppe after a pipeline leak (La Crau plain, South-Eastern France). *Ecol. Eng.*, *71*, 690–702.
- Corrales Ramírez, L. C., A. G. Z. Y., & M. B. V. E. (2014). *Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal*.
- de Lajudie, P., Willems, A., Nick, G., Mohamed, S. H., Torck, U., Coopman, R., Filali-Maltouf, A., Kersters, K., Dreyfus, B., Lindström, K., & Gillis, M. (1999). *Agrobacterium* bv. 1 Strains Isolated from Nodules of Tropical Legumes. *Syst. Appl. Microbiol.*, *22*, 119–132.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., & Okon, Y. (2003). Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere. *Crit. Rev. Plant Sci.*, *22*, 107–149.
- Fernández, L. A., Zalba, P., Gómez, M. A., & Sagardoy, M. A. (2007). Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions. *Biol. Fertil. Soils*, *43*(6), 805–809.
- Fitzpatrick, C. R., Copeland, J., Wang, P. W., Guttman, D. S., Kotanen, P. M., & Johnson, M. T. J. (2018). Assembly and ecological function of the root microbiome across angiosperm plant species. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, *115*.
- Galloway, J. N., Aber, J. D., Erisman, J. W., Seitzinger, S. P., Howarth, R. W., Cowling, E., Cosby, J. 2003. The Nitrogen Cascade. *BioScience* *53*:341-356.
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, *2012*, 1–15.
- Gopal, M., & Gupta, A. (2016). Microbiome Selection Could Spur Next-Generation Plant Breeding Strategies. *Front. Microbiol.*, *7*.
- Goswami, D., Thakker, J. N., & Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, *2*.
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiol. Res.*, *206*, 131–140.
- Guiñazú, L. B., Andrés, J. A., del Papa, M. F., Pistorio, M., & Rosas, S. B. (2010). Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. *Biol. Fertil. Soils*, *46*(2), 185–190.
- Gupta, R., Singal, R., Shankar, A., Kuhad, R. C., & Saxena, R. K. (1994). A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *J. Gen. Appl. Microbiol.* *40*, 255–260.
- Gutiérrez-Mañero, F. J., Ramos-Solano, B., Probanza, A., Mehouchi, J., R. Tadeo, F., & Talon, M. (2001). The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.*, *111*, 206–211.
- Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F., & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.*, *43*, 895–914.
- Howieson J.G. and Dilworth M.J. (Eds.). 2016. Working with rhizobia. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J. Clin. Microbiol.*, *45*, 2761–2764.
- Kämpfer, P., Wellner, S., Lohse, K., Martin, K., & Lodders, N. (2012). *Duganella phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the leaf surface of *Trifolium repens* and proposal to reclassify *Duganella violaceinigra* into a novel genus as *Pseudoduganella violaceinigra* gen. nov., comb. nov. *Syst. Appl. Microbiol.*, *35*, 19–23.
- Kim, S.-J., Moon, J.-Y., Lim, J.-M., Ahn, J.-H., Weon, H.-Y., Ahn, T.-Y., & Kwon, S.-W. (2014). *Sphingomonas aerophila* sp. nov. and *Sphingomonas naasensis* sp. nov., isolated from air and soil, respectively. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, *64*, 926–932.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, *16*, 111–120.

- Kirui, C. K., Njeru, E. M., & Runo, S. (2022). Diversity and Phosphate Solubilization Efficiency of Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Semi-Arid Agroecosystems of Eastern Kenya. *Microbiol. Insights*, *15*, 117863612210889.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, and Tamura K (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.*, *35*:1547-1549
- León-Barrios, M., Lorite, M. J., Donate-Correa, J., & 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. *Syst. Appl. Microbiol.*, *32*, 413–420.
- León-Barrios, M., Pérez-Yépez, J., Dorta, P., Garrido, A., & Jiménez, C. (2017). Alkalinity of Lanzarote soils is a factor shaping rhizobial populations with *Sinorhizobium meliloti* being the predominant microsymbiont of *Lotus lancerottensis*. *Syst. Appl. Microbiol.*, *40*, 171–178.
- Lin DX, Wang ET, Tang H, Han TX, He YR, Guan SH, Chen WX. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2008 *58*(6):1409-1413.
- Lorite, M. J., Donate-Correa, J., del Arco-Aguilar, M., Pérez Galdona, R., Sanjuán, J., & León-Barrios, M. (2010). *Lotus* endemic to the Canary Islands are nodulated by diverse and novel rhizobial species and symbiotypes. *Syst. Appl. Microbiol.*, *33*, 282–290.
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, *63*, 541–556.
- Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). The Nodule Microbiome: N₂-Fixing Rhizobia Do Not Live Alone. *Phytobiomes J.*, *1*, 70–82.
- Menéndez, E., Pérez-Yépez, J., Hernández, M., Rodríguez-Pérez, A., Velázquez, E., & León-Barrios, M. (2020). Plant Growth Promotion Abilities of Phylogenetically Diverse *Mesorhizobium* Strains: Effect in the Root Colonization and Development of Tomato Seedlings. *Microorganisms*, *8*, 412.
- Muresu, R., Polone, E., Sulas, L., Baldan, B., Tondello, A., Delogu, G., Cappuccinelli, P., Alberghini, S., Benhizia, Y., Benhizia, H., Benguedouar, A., Mori, B., Calamassi, R., Dazzo, F. B., & Squartini, A. (2008). Coexistence of predominantly nonculturable rhizobia with diverse, endophytic bacterial taxa within nodules of wild legumes. *FEMS Microbiol. Ecol.*, *63*, 383–400.
- Muresu, R., Porceddu, A., Sulas, L., & Squartini, A. (2019). Nodule-associated microbiome diversity in wild populations of *Sulla coronaria* reveals clues on the relative importance of culturable rhizobial symbionts and co-infecting endophytes. *Microbiol. Res.*, *221*, 10–14.
- Murugesan, S., Manoharan, C., Vijayakumar, R., & Panneerselvam, A. (2010). Isolation and characterization of *Agrobacterium rhizogenes* from the root nodules of some leguminous plants. *Int. J. Microbiol. Res.*, *1*, 92–96.
- Oelze, J. (2000). Respiratory protection of nitrogenase in *Azotobacter* species: is a widely held hypothesis unequivocally supported by experimental evidence? *FEMS Microbiol. Rev.*, *24*, 321–333.
- Patel, S., & Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, *70*, 406–438.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.*, *42*, 207–220.
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M. H., Velázquez, E., & Bedmar, E. J. (2015). Bacterial Associations with Legumes. *Crit. Rev. Plant Sci.*, *34*, 17–42.
- Pikovskaya, R.I. (1948) Mobilization of Phosphorus in Soil Connection with the Vital Activity of Some Microbial Species. *Microbiol.*, *17*, 362-370.
- Ramos Solano, B., Barriuso, J., & Gutierrez Mañero, F. J. (2008). Physiological and Molecular Mechanisms of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). In *Plant-Bacteria Interactions* (pp. 41–54).
- Rejili M, Ruiz-Argueso T, Mars M. Novel putative *Mesorhizobium* and *Ensifer* genomospecies together with a novel symbiovar *psoraleae* nodulate legumes of agronomic interest grown in Tunisia. *Syst Appl Microbiol.* 2020 Mar;*43*(2):126067.
- Rivas, R., Peix, A., Mateos, P. F., Trujillo, M. E., Martínez-Molina, E., & Velázquez, E. (2006). Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different Spanish soils. *Plant Soil*, *287*, 23–33.
- Rigaud J., & Puppo A. (1975) Indole-3- acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.*, 1975, *88*, 223-228.
- Rodríguez, H., & Fraga, R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol. Adv.*, *17*(4–5), 319–339.
- Rondon, M. R., Ballering, K. S., & Thomas, M. G. (2004). Identification and analysis of a siderophore biosynthetic gene cluster from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Microbiology*, *150*(11), 3857–3866.

- Rutten, P. J., & Poole, P. S. (2019). Oxygen regulatory mechanisms of nitrogen fixation in rhizobia. *Adv. Microb. Physiol.*, 75, 325–389.
- Saitou N, & Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*
- SantaCruz-Calvo, L., González-López, J., & Manzanera, M. (2013). *Arthrobacter siccitolerans* sp. nov., a highly desiccation-tolerant, xeroprotectant-producing strain isolated from dry soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 63(11), 4174–4180.
- Sevillano, F., & Rodríguez Barrueco, C. (1987). Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en agricultura. *Avances en la Biología de la Fijación de Nitrógeno Atmosférico*, 9–29.
- Shakirova, F. M., Sakhabutdinova, A. R., Bezrukova, M. v, Fatkhutdinova, R. A., & Fatkhutdinova, D. R. (2003). Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. *Plant Sci.*, 164, 317–322.
- Soares, R., Trejo, J., Lorite, M. J., Figueira, E., Sanjuán, J., & Videira e Castro, I. (2020). Diversity, Phylogeny and Plant Growth Promotion Traits of Nodule Associated Bacteria Isolated from *Lotus parviflorus*. *Microorganisms*, 8, 499.
- Sprent, J. I. (2007). Evolving ideas of legume evolution and diversity: a taxonomic perspective on the occurrence of nodulation. *New Phytol.*, 174, 11–25.
- Ureta, A., & Nordlund, S. (2002). Evidence for Conformational Protection of Nitrogenase against Oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a Putative FeSII Protein. *J. Bacteriol.* 184, 5805– 5809.
- Vandenkoornhuys, P., Quaiser, A., Duhamel, M., le Van, A., & Dufresne, A. (2015). The importance of the microbiome of the plant holobiont. *New Phytol.*, 206, 1196–1206.
- Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*.
- Wang, L. L., Wang, E. T., Liu, J., Li, Y., & Chen, W. X. (2006). Endophytic Occupation of Root Nodules and Roots of *Melilotus dentatus* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Microb. Ecol.*, 52, 436–443.
- Wubs, E. R. J., van der Putten, W. H., Bosch, M., & Bezemer, T. M. (2016). Soil inoculation steers restoration of terrestrial ecosystems. *Nat. Plants*, 2, 16107.
- Yan, J., Li, Y., Han, X. Z., Chen, W. F., Zou, W. X., Xie, Z., & Li, M. (2017). *Agrobacterium deltaense* sp. nov., an endophytic bacteria isolated from nodule of *Sesbania cannabina*. *Arch. Microbiol.*, 199(7), 1003–1009.
- Yang, W., Kong, Z., Chen, W., & Wei, G. (2013). Genetic diversity and symbiotic evolution of rhizobia from root nodules of *Coronilla varia*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 36(1), 49–55.
- Zheng, Y., Liang, J., Zhao, D.-L., Meng, C., Xu, Z.-C., Xie, Z.-H., & Zhang, C.-S. (2020). The Root Nodule Microbiome of Cultivated and Wild Halophytic Legumes Showed Similar Diversity but Distinct Community Structure in Yellow River Delta Saline Soils. *Microorganisms*, 8, 207.
- Zhu, L., Si, M., Li, C., Xin, K., Chen, C., Shi, X., Huang, R., Zhao, L., Shen, X., & Zhang, L. (2015). *Sphingomonas gei* sp. nov., isolated from roots of *Geum aleppicum*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65(4), 1160–1166.

