

**Caracterización taxonómica y simbiótica de rizobios
que nodulan *Spartocytisus supranubius* en el P. N. del
Teide**

**Taxonomic and symbiotic characterization of rhizobia
nodulating *Spartocytisus supranubius* in Teide N. P.**



Trabajo de Fin de Grado
Ayose Medina Cabrera
Tutorizado por Milagros León Barrios
Grado en Biología. Septiembre de 2018

Índice

1.	Introducción	3
1.1.	Fijación del nitrógeno.....	3
1.2.	Simbiosis.....	3
1.3.	Ecosistema y retama del Teide.....	4
1.4.	Los géneros <i>Bradyrhizobium</i> y <i>Bosea</i>	5
1.5.	Enzima ACC desaminasa.....	6
1.6.	Gen del ARN ribosómico 16S y otros <i>Housekeeping</i>	7
2.	Objetivos.....	9
3.	Material y métodos	10
3.1.	Medios de cultivo	10
3.2.	Amplificación y Secuenciación	10
3.2.1.	Amplificación	10
3.2.2.	Electroforesis.....	13
3.2.3.	Secuenciación y análisis filogenético	13
3.3.	Test de Nodulación.....	13
3.3.1.	Cepas de rizobios utilizadas	13
3.3.2.	Ensayo de germinación	14
3.3.3.	Infección de las semillas.....	14
3.3.4.	Crecimiento de las plantas	14
3.3.5.	Aislamiento de bacterias en los nódulos.....	14
3.4.	Actividad ACC desaminasa	15
4.	Resultados y Discusión	15
4.1.	Secuenciación y análisis filogenético	15
4.1.1.	Filogenia del gel del ARN ribosómico 16S.....	15
4.1.2.	Filogenia del gen <i>recA</i> del género <i>Bradyrhizobium</i>	18
4.1.3.	Filogenia del gen <i>glnII</i>	19
4.1.4.	Filogenia de los genes <i>recA</i> y <i>gyrB</i> del género <i>Bosea</i>	20
4.1.5.	Filogenia de los genes concatenados.....	21
4.2.	Test de Nodulación.....	22
4.3.	Actividad ACC desaminasa	26
5.	Conclusiones.....	27
6.	Bibliografía.....	29

Resumen

Spartocytisus supranubius (la retama del Teide) es un endemismo de las cumbres de Tenerife y la Palma. En Tenerife crece entre los 2000-3100 m en el Parque Nacional del Teide. En estos ecosistemas de la alta montaña canaria, *S. supranubius* es la leguminosa dominante, y como leguminosa, es capaz de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con los rizobios. Los suelos de las Cañadas del Teide son pobres en nitrógeno y su principal fuente es posiblemente la Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) proveniente de la simbiosis con los rizobios. Actualmente, debido al retroceso que sufren las poblaciones de retama, la FBN en este ecosistema puede verse influenciada negativamente. En este trabajo caracterizamos una colección de rizobios aislados previamente en una población de retamas en la zona sureste del Parque. Se ha realizado una caracterización taxonómica a partir del análisis filogenético de las secuencias del ADN ribosómico 16S (gen *rrs*) y de dos genes codificadores de proteínas, que dependiendo del género de bacterias fueron: los genes *recA* y *glnII* o los genes *recA* y *gyrB*. Se presenta la filogenia individual de cada gen y el de los tres genes concatenados. Por otro lado, se presentan los datos de los tests de infectividad de los dos géneros principales identificados en este trabajo, *Bradyrhizobium* y *Bosea*. Finalmente, se realiza un *screening* de la presencia de la enzima ACC desaminasa en una selección de estas cepas de rizobios.

Palabras clave: *Spartocytisus supranubius*, *Bradyrhizobium*, *Bosea*, filogenia, nodulación.

Abstract

Spartocytisus supranubius (Teide broom) is an endemic species that grows on the summits of Tenerife and La Palma. In Tenerife, it grows between 2000-3100 m in Teide National Park. In these ecosystems of the Canarian high mountain, *S. supranubius* is the dominant legume. Being a *Leguminosae*, it is able to establish symbiosis with rhizobia. Soils in Las Cañadas del Teide are poor in nitrogen and the main nitrogen source is through the Biological Fixation of Nitrogen (FBN) generated by the rhizobia symbiosis. Currently, due to the decline occurred in the population of this species, the introduction of nitrogen into the biosphere could be negatively influenced. In this work, we characterise a collection of rhizobial strains previously isolated from a southeast Teide broom population. A taxonomic study was performed from the phylogenetic analysis

from sequences of the 16S ribosomal RNA gene and other two coding genes, that depending on the genus were *recA* and *glnII* or *recA* and *gyrB*. We present individual and concatenated (3 genes) phylogenies. Furthermore, a nodulation test is carried out with selected strains of genera *Bradyrhizobium* and *Bosea* on Teide broom plants. Finally, it is performed an assay for the presence of the ACC deaminase enzyme in a selection of these strains of rhizobia.

Keywords: *Bradyrhizobium*, *Bosea*, *Spartocytisus supranubius*. phylogeny, nodulation.

1. Introducción

1.1. Fijación del nitrógeno

El nitrógeno es un elemento necesario para la composición de moléculas indispensables para el funcionamiento y crecimiento de los organismos, como son las proteínas y los ácidos nucleicos. A pesar de que es un elemento abundante en este ecosistema, la mayor parte se encuentra en forma gaseosa, como dinitrógeno (N₂), una forma casi inerte de este elemento no aprovechable por la mayoría de los seres vivos. Esto lo convierte, junto con el agua, en uno de los nutrientes más limitantes de la biosfera (Durán *et al.*, 2013).

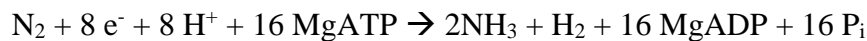
La fijación del nitrógeno es un proceso en el que el dinitrógeno atmosférico se reduce con hidrógeno para dar amonio. Al contrario del dinitrógeno, el nitrógeno reducido es una forma que ya puede incorporarse a la biosfera y ser utilizados por numerosos seres vivos. La fijación del nitrógeno puede ocurrir de forma abiótica por procesos químicos espontáneos como la oxidación que se genera por la acción de los rayos en las tormentas, produciendo óxidos de nitrógeno. Sin embargo, la principal fuente de fijación del nitrógeno ocurre de forma biótica por la acción de microorganismos y, por ello denominada Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) (Calvo, 2011). El conjunto de microorganismos capaces de fijar el nitrógeno atmosférico se denomina diazotrofos. Estos microorganismos son exclusivamente procarióticos e incluyen tanto bacterias de vida libre muy diversas, como cianobacterias, diversos grupos fisiológicos de bacterias Gram positivas (como algunas especies de clostridios), Gram negativas (como *Azotobacter*, *Azospirillum* o *Klebsiella*) así como algunas arqueas metanógenas. Otros organismos diazotrofos, sin embargo, sólo fijan el nitrógeno en simbiosis con plantas. Los actinomicetos del género *Frankia* fijan nitrógeno en simbiosis con plantas de varias familias, pero el grupo de bacterias Gram negativas conocidas con el término general de “rizobios” sólo lo hace en simbiosis con las plantas de la familia *Leguminosae* (Mayz-Figueroa, 2004). Estos procariotas endosimbióticos infectan las raíces de las leguminosas y se adentran en el tejido radical produciendo finalmente nódulos radicales donde las bacterias llevan a cabo la fijación del nitrógeno.

1.2. Simbiosis

La simbiosis entre los rizobios y las leguminosas es un proceso específico y complejo que es iniciado por el intercambio de moléculas de reconocimiento entre las

rizobacterias y las leguminosas. Las raíces de las leguminosas secretan flavonoides capaces de inducir la expresión de genes de nodulación (genes *nod*). Estos genes generan la producción de un lipoquitooligosacárido específico de cada rizobio denominados factores Nod. Estos factores son reconocidos por receptores quinasas de la leguminosa hospedadora específica para ese rizobio, lo que desencadena el desarrollo de nódulos radicales (Durán *et al.*, 2013). Dentro del nódulo, el rizobio se diferencia a bacteroide, un estado que expresa los genes de fijación (*fix*, *nif*) permitiendo la síntesis de la enzima responsable de fijar el nitrógeno, la nitrogenasa (David *et al.*, 1988).

Todas las bacterias fijadoras de nitrógeno, tanto de vida libre como simbiótica, presentan este complejo enzimático de la nitrogenasa, que cataliza una reducción endergónica del dinitrógeno atmosférico (N₂) a amonio (NH₃), representada en el siguiente esquema:



El complejo nitrogenasa se encuentra formada por dos subunidades, dinitrógeno-reductasa y la dinitrogenasa. La primera presenta un centro metálico que contiene átomos de hierro que funciona como donador de electrones, dependiente de ATP, al segundo componente. La subunidad dinitrogenasa presenta un complejo molibdeno y hierro (MoFe) que representa el sitio catalítico de la reacción endergónica (Dixon & Kahn, 2004).

La capacidad y especificidad para nodular una u otra leguminosa depende de los genes simbióticos y la mayoría de los genomas rizobiales caracterizados hasta la fecha presentan genes de nodulación y fijación de nitrógeno agrupados en plásmidos o en grandes islas simbióticas cromosómicas, cuyos genes son necesarios para el establecimiento y mantenimiento de las simbiosis diazotrófica con la planta huésped (Durán *et al.*, 2013). Los genes de nodulación determinan el rango de hospedadores y son utilizados para definir las variedades simbióticas o simbiovars. Dependiendo de los genes de nodulación alojados, varios simbiovars se han descrito recientemente en los géneros de rizobios generados por transferencia lateral de la información genética (Year *et al.*, 2011).

1.3. Ecosistema y retama del Teide

La retama del Teide (*Spartocytisus supranubius*) es una planta arbustiva endémica de Canarias. Se encuentra principalmente en las zonas alpinas de Las Cañadas del Teide (Tenerife) y en las zonas montañosas de La Palma. Actualmente, la población de esta

especie se encuentra en peligro de extinción y está principalmente afectada por la acción hervíhora del conejo *Oryctolagus cuniculus* debido a la alta tasa de desaparición de ejemplares juveniles. Además, la especie presenta adaptaciones para sobrevivir a las duras condiciones climáticas del ecosistema al presentar una alta diurnalidad, alta insolación y bajas precipitaciones (Kyncl *et al.*, 2006). Las semillas de la retama del Teide son duras, lo que dificulta su germinación y hace necesario un tratamiento de escarificación antes de trabajar con ellas.

El contenido de nitrógeno en el suelo situado en las Cañadas del Teide sugiere que probablemente sea contribuido sustancialmente por la fijación de nitrógeno simbiote en la retama del Teide (Wheeler & Dickson, 1990).

1.4. Los géneros *Bradyrhizobium* y *Bosea*

En un estudio previo se abordó el aislamiento de rizobios a partir de suelos de varias zonas del P. N. del Teide bajo la influencia de la rizosfera de la retama, en zonas con letrinas de conejos y suelos control. Como resultado de ese estudio se aislaron rizobios diversos, siendo las cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium* el predominante, seguido en menor medida por cepas del género *Bosea*. En este TFG se completa y se profundiza en la caracterización taxonómica y se aborda el estudio de las propiedades simbióticas de esos aislados.

El género *Bradyrhizobium* es un grupo de bacterias gram negativas del suelo, perteneciente al grupo de los rizobios. Conjuntamente con *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*, es uno de los géneros principales capaces de fijar nitrógeno con muchas especies de leguminosas. Los rizobios son alfaproteobacterias que actualmente se distribuyen en varias familias. Los miembros del género *Bradyrhizobium* se caracterizan por presentar un crecimiento lento y se incluye dentro de la familia *Bradyrhizobiaceae* (Garrity *et al.*, 2004). Es de resaltar que, aunque el número de especies descritas en 2005 en el manual de Bergey eran tan sólo tres (*B. japonicum*, *B. elkanii* y *B. liaoningense*), el número actual de especies de *Bradyrhizobium* es de 39 (<http://www.bacterio.net/bradyrhizobium.html>), y de ellas más de la mitad se han descrito en los años 2014-2016 (<https://www.bacterio.net>).

Bosea es otro género de la familia *Bradyrhizobiaceae*. Son bacterias caracterizadas también por un crecimiento lento. Típicamente forma colonias blancas, mucosas y convexas con manitol como fuente de carbono tras 5-7 días de incubación. El género se describió inicialmente con la especie *B. thiooxidans* (Garrity *et al.*, 2004), pero

actualmente incluye 9 especies válidamente descritas (<http://www.bacterio.net/bosea.html>). Algunas de ellas han sido aisladas como endófitos de los nódulos radicales de leguminosas (De Meyer & Willems, 2012; Safronova *et al.*, 2015), aunque se ha detectado la presencia del gen *nodC* (Rincón *et al.*, 2008), no se ha confirmado que este género nodule y fije nitrógeno (Safronova *et al.*, 2015), por lo que su presencia en el nódulo podría deberse a que son bacterias oportunistas que “se cuelan” conjuntamente con el rizobio, o que si tienen genes simbióticos, podrían estar alojados en plásmidos que se pierden durante el proceso de aislamiento y purificación.

Uno de los objetivos que se persigue en este trabajo es la generación de nódulos por el género *Bosea* en plantas de la retama del Teide.

1.5. Enzima ACC desaminasa

Entre las bacterias que colonizan la rizosfera de las plantas, se encuentra un grupo con capacidad de promover el crecimiento y desarrollo vegetal gracias a distintos mecanismos y, por ello, son denominadas como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal o PGPR (del inglés “Plant Growth-Promoting Rhizobacteria”). Estos mecanismos de promoción vegetal pueden ser directos o indirectos (Glick, 2014). Uno de los mecanismos directos es precisamente la fijación del nitrógeno. También son mecanismos directos la aportación de otros nutrientes esenciales como fósforo, mediante solubilización bacteriana de formas insolubles (Khan *et al.*, 2009), o el aporte de hierro, por producción de sideróforos (Antoun, 2013). Un mecanismo muy interesante está relacionado con el alivio del estrés abiótico y biótico en las plantas. La 1-aminocyclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa es una enzima capaz de regular en los vegetales los niveles de la fitohormona etileno. Las bacterias ACCd + asociadas a la raíz alivian las consecuencias negativas que tiene diversos tipos de estrés sobre el desarrollo de las plantas, al degradar el ACC, precursor del etileno, a alfa-cetoglutarato y amonio, bajando los niveles del “etileno de estrés” que acumula el organismo en condiciones de estrés y que tan negativamente afecta su desarrollo (Glick, 2014).

El etileno es una hormona vegetal pleiotrópica que se encuentra en todas las plantas superiores. Es un modulador importante del crecimiento y desarrollo normal de las plantas, así como una molécula clave en la respuesta de las plantas a un amplio rango de distintos tipos de estrés generados por el ambiente. Muchos aspectos del crecimiento de los tejidos de las plantas como raíces, tallos, hojas, flores y frutos, así como las etapas del desarrollo de la planta se ven afectados por el etileno (Glick, 2014). En situaciones de

estrés prolongado, generados por estímulos ambientales como la alta insolación y deshidratación que sufre la retama del Teide en su ecosistema, puede generar efectos perjudiciales en la fisiología de la planta como clorosis, senescencia y abscisión.

La actividad ACCd se ha descrito en diversas bacterias del suelo, entre ellas, en rizobios. En estas bacterias, la ACCd al degradar el ACC genera amoníaco, cuyo nitrógeno es aprovechado por la planta (Penrose & Glick, 2003). Por tanto, esta enzima tiene dos efectos beneficiosos para el organismo vegetal: reduce las cantidades de etileno y le aporta nitrógeno.

En este TFG valoramos de manera indirecta la presencia de ACCd ensayando la capacidad de la colección de rizobios de retama para crecer con ACC como única fuente de nitrógeno (sólo la presencia de ACCd explicaría el crecimiento con ACC).

1.6. Gen del ARN ribosómico 16S y otros *Housekeeping*

El desarrollo de métodos de secuenciación rápidos y económicamente asequibles ha sido una revolución en la identificación de las especies procarióticas. La secuenciación del gen que codifica el ARN ribosómico 16S supuso una revolución en Taxonomía bacteriana. En efecto, el análisis de las secuencias del gen del ARNr 16S a la clasificación de procariotas es hoy el eje central en la taxonomía bacteriana y por ello, forma parte de los mínimos estándares exigidos para la clasificación de aislados en especies procarióticas, siendo obligatoria la secuenciación completa de este gen en, al menos, la cepa tipo de cada especie. Hoy existen varias bases de datos donde se pueden obtener las secuencias de este gen para todas las cepas tipo de las especies de bacterias oficialmente reconocidas, como la EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) utilizada en este trabajo.

En lo que se refiere a los métodos de análisis utilizados, actualmente se requiere que el análisis filogenético del ARNr 16S se lleve a cabo al menos por dos métodos diferentes que habitualmente incluyen métodos de distancias como el “Neighbour-Joining” y métodos basados en parsimonia y probabilidad como el “Maximum Likelihood”.

Las ventajas del ARNr 16S para clasificar aislados procarióticos es un hecho evidente, pero tiene sus limitaciones. Estas secuencias están muy conservadas, de tal forma que son incapaces de diferenciar entre especies cercanas. Mientras que los aislados que comparten menos de un 97% de similitud en las secuencias de este gen suelen tener menos del 70% de homología en experimentos de hibridación genómica ADN-ADN y

por ello, pueden considerarse distintas especies, lo contrario, no es cierto, es decir, aislados con similitudes por encima del 97% en sus secuencias del 16S pueden tener porcentajes de hibridación genómica muy inferiores al 70%, de modo que pertenecen a distintas especies. Además, algunas críticas señalan el hecho de que se trata de la filogenia de un único gen y, por lo tanto, no necesariamente es el reflejo de la filogenia de todo el genoma. En consecuencia, durante 10-15 años se ha comenzado a secuenciar otros genes que codifican proteínas esenciales para la supervivencia celular, denominados genes “*housekeeping*”. Son genes implicados en procesos esenciales para el mantenimiento celular como la división y el metabolismo celular (*recA*, *atpD*, *glnB*, *dnaK*, *gyrB*, *rpoB*, etc.) y que tienen una tasa mayor de evolución permitiendo diferenciar especies filogenéticamente próximas. Pero tampoco esta estrategia está exenta de problemas. Mientras que existe un consenso general sobre los porcentajes de identidad del gen 16S que delimitan entre especies y géneros diferentes (97% y 95%, respectivamente), en el caso de los genes “*housekeeping*” no está claro debido a que no se han secuenciado los mismos genes en todos los grupos de bacterias, en algunos casos porque no son genes universales y porque el mismo gen puede presentar distinta tasa evolutiva entre grupos. Todo ello hace necesario valorar el grupo de genes *housekeeping* más apropiado para el grupo de procariotas a estudiar. La manera correcta de hacerlo es secuenciar primero el gen del ARNr 16S para identificar el género, y luego, en función del resultado, seleccionar el grupo más apropiado de genes *housekeeping*.

Por otro lado, la filogenia de estos genes se puede presentar de manera individual, pero en los últimos años se ha visto la ventaja de preparar una filogenia de las secuencias concatenadas de varios de estos genes *housekeeping* lo que denomina “Multilocus Sequence Analysis” (MLSA). Estos árboles filogenéticos permiten una mejor delimitación de las especies y está siendo aplicado con éxito a la delimitación de especies de los rizobios. En este grupo, las secuencias más utilizadas son la de los genes *recA* (recombinasa A, del sistema de recombinación homóloga), *atpD* (subunidad F1-beta de la ATP-Sintasa), *glnII* (glutamina sintetasa II), *gyrB* (subunidad B de la DNA girasa) y *rpoB* (subunidad-b de la RNA polimerasa) (Menna *et al.*, 2007).

2. Objetivos

En este trabajo se persiguen diferentes objetivos generales relacionados con bacterias asociadas a la retama del Teide:

1. Identificar los rizobios que nodulan la retama del Teide a partir del análisis filogenético del gen 16S y de los genes *housekeeping recA*, *glnII* y *gyrB*
2. Estudiar las características simbióticas de varias cepas de los géneros *Bradyrhizobium* y *Bosea*: nodulación y eficacia simbiótica sobre la retama del Teide
3. Evaluación de la presencia de la actividad ACC desaminasa en los rizobios del cepario

3. *Material y métodos*

3.1. **Medios de cultivo**

Se describen a continuación los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las bacterias y la solución nutritiva utilizada para el crecimiento de las plantas.

El medio Yeast Manitol Agar (YMA) es utilizado para el crecimiento rutinario de rizobios: mantenimiento de la colección de rizobios, resiembras y preinóculos. Su composición es: 0,5 g de K_2HPO_4 ; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1 g de NaCl; 0,8 g de extracto de levadura; 8 g de manitol; 15 g agar en 1 litro de agua. Ajustar el pH a 6,8-7,0. El medio de Rigaud & Puppo (R&P) es una solución nutritiva para el crecimiento de las plantas. Su composición es: 0,15 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,15 g de KH_2PO_4 ; 0,15 g de KCl; 0,05 g de $CaCl_2$; 0,025 g de Sequestreno (Fe); 0,4 g de NO_3K ; 1 ml de solución elementos traza en 1 litro de agua. Ajustar el pH a 6,8-7,0. El medio R&P puede prepararse con aporte de nitrógeno (0,4 g/l NO_3K) (control positivo) o sin nitrógeno (control negativo). La evaluación de ACC requiere de la preparación del medio mínimo Bergensen. Su composición es: 0,45 g de $PO_4HNa_2 \cdot 12H_2O$; 0,10 g de $SO_4Mg \cdot 7H_2O$; 0,02 g de Cl_3Fe ; 0,04 g de Cl_2Ca ; 0,38 g de $PO_4H_2NH_4$; 10 g de manitol; 0,29 g de NO_3K ; 8 g de agar en 1 litro de agua. Ajustar el pH a 6,8-7,0. El medio puede prepararse con NO_3K (control positivo) para el aporte de nitrógeno o sin NO_3K (control negativo).

3.2. **Amplificación y Secuenciación**

El ADN genómico se obtuvo de un trabajo anterior realizado con el kit comercial AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (BioRad), siguiendo el protocolo recomendado para la extracción de ADNg de bacterias gram negativas.

3.2.1. Amplificación

En este trabajo se realiza un análisis filogenético basado en la amplificación y secuenciación del gen del ARN ribosómico 16S y de otros tres genes codificadores de proteínas en una selección de las cepas ya aisladas a partir de nódulos de retama. Las secuencias 16S de un trabajo previo se completan, se corrigen y se hacen nuevas.

La Tabla 1 recoge los primers utilizados para la amplificación de los genes ARNr 16S, *glnII*, *recA* y *gyrB* que son descritas previamente por Pérez *et al.*, 2014, excepto para los primers de *recA* en *Bosea* que se siguió el protocolo de Safronova *et al.*, 2015:

Tabla 1. *Primers*

Gen	Primers	Referencia
16S	fD1, rD1, P5, P870	(Weisburg <i>et al.</i> , 1991)
<i>glnII</i>	glnII-12F, glnII-689R	(Pérez-Yépez <i>et al.</i> , 2014)
<i>gyrB</i>	gyrBF, gyrBR	(Pérez-Yépez <i>et al.</i> , 2014)
<i>recA</i>	recA63F, recA555R, recA504R	(Pérez-Yépez <i>et al.</i> , 2014)
<i>recA</i>	DBrecAF, DBrecAR	(Safronova <i>et al.</i> , 2015)

Para la reacción de amplificación (Tabla 2) se usó la premix Taq de Takara (Takara TAQTM), que contiene todos los componentes necesarios (Taq-polimerasa, *buffer*, MgCl₂ y dNTP (desoxirribonucleótidos-trisfosfato) a excepción de los primers y el ADN genómico de la cepa que se desea amplificar. La mezcla de reacción se ajusta con agua para obtener un volumen final de 20 µl:

Tabla 2. *Mezcla de reacción de PCR*

Componentes	Volumen (µl)
Pmix Taq (Takara)	10
Primer forward	1
Primer reverse	1
Agua	6
ADN genómico	2
Volumen total	20

La amplificación del gen ADNr 16S se realiza siguiendo un protocolo estándar que se muestra en la Tabla 3:

Tabla 3. *Parámetros de amplificación de 16S*

<u>Gen ADNr 16S</u>	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	3 min, 30 s
30 ciclos de:		
Desnaturalización	94°C	1 min, 10 s
Anillamiento	56°C	40 s
Extensión	72°C	2 min, 10 s
Extensión final	72°C	6 min, 20 s

El gen *glnII* se amplificó para los rizobios del género *Bradyrhizobium* siguiendo los parámetros de la Tabla 4 (Menna *et al.*, 2009):

Tabla 4. Parámetros de amplificación de *glnII*

<u>Gen <i>glnII</i></u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>
Desnaturalización inicial	95°C	5 min
30 ciclos de:		
Desnaturalización	94°C	45 s
Anillamiento	58°C	1 min
Extensión	74°C	1 min, 30 s
Extensión final	74°C	1 min

El gen *gyrB* se amplificó para las cepas del género *Bosea* siguiendo los parámetros de la Tabla 5 (Safronova *et al.*, 2015):

Tabla 5. Parámetros de amplificación de *gyrB*

<u>Gen <i>gyrB</i></u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>
Desnaturalización inicial	95°C	2 min
35 ciclos de:		
Desnaturalización	94°C	45 s
Anillamiento	57°C	45 s
Extensión	72°C	1 min, 30 s
Extensión Final	72 °C	6 min, 10 s

El gen *recA* se encuentra presente en ambos géneros, pero los parámetros de amplificación son distintos y se describen en las Tablas 6 y 7 (Menna *et al.*, 2009; Safronova *et al.*, 2015):

Tabla 6. Parámetros de amplificación de *recA* para *Bradyrhizobium*

<u>Gen <i>recA</i> (<i>Brady.</i>)</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>
Desnaturalización inicial	95°C	5 min
30 ciclos de:		
Desnaturalización	94°C	45 s
Anillamiento	50°C	1 min
Extensión	74°C	1 min, 30 s
Extensión final	74°C	1 min

Tabla 7. Parámetros de amplificación de *recA* para *Bosea*

<u>Gen <i>recA</i> (<i>Bosea</i>)</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>
Desnaturalización inicial	95°C	2 min
35 ciclos de:		
Desnaturalización	94°C	45 s
Anillamiento	60°C	45 s
Extensión	72°C	5 min
Extensión final	72°C	6 min 10 s

3.2.2. Electroforesis

Los fragmentos amplificados en PCR se revelaron en una electroforesis en geles de agarosa al 1% con tampón TAE 1X. En el momento de preparar el gel se añade Midori Green (0,8 µl de Midori/100 ml de gel) como colorante para revelar las bandas de ADN. El marcador de peso molecular utilizado es el de 100 bp ladder (Takara), que presenta bandas entre 1500 y 100 pb. En cada pocillo se carga con un volumen total de 10 µl (6 µl de mezcla, 1 µl de tampón de carga X10 y 3 µl de H₂O). El gel se somete a 60V durante aproximadamente 2 horas. Las imágenes de los geles se fotografían y se guardan en formato TIFF, utilizando el equipo de captura de imágenes de geles (Image Master Vídeo Documentation System, Amersham-Pharmacia Biotech) y el programa LISCAP. Una vez comprobado la amplificación del tamaño correcto del gen, se preparan alícuotas de los amplicones para secuenciación.

3.2.3. Secuenciación y análisis filogenético

Las alícuotas de los genes amplificados correctamente se preparan y se envían a secuenciar a la empresa MacroGen, siguiendo las instrucciones de esta última. Las secuencias recibidas se analizaron con el software MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

En el alineamiento de las secuencias se realiza con la herramienta Clustal W del programa MEGA 7. Los árboles filogenéticos se construyeron con el método Neighbour-Joining y el parámetro de distancias Kimura-2 (NJ-K2p), y usando el método de Bootstrap (BS) con 1000 réplicas para el cálculo del soporte de los nodos en las ramas. En el alineamiento se usa como referencia genes de las cepas tipo de las especies más próximas obtenidas del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.gov/Blast>). Para las secuencias 16S, se calcula los porcentajes de similitud de cada cepa con la cepa tipo de la especie más próxima en la base de datos EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>). Para los genes *housekeeping*, se calcula la p-distancia para determinar la similitud de cada cepa con la cepa tipo de la especie más próxima usando el programa MEGA7.

3.3. **Test de Nodulación**

3.3.1. Cepas de rizobios utilizadas

Las cepas elegidas para el test de nodulación en el género *Bradyrhizobium* fueron SSUT-1, SSUT-3, SSUT-18, SSUT-31 y SSUT-36, y para el género *Bosea* las cepas SSUT-16, SSUT-22 y SSUT-24.

Además, se pusieron plantas control positivo (sin rizobio y con fertilización química de nitrógeno) y plantas control negativo (sin rizobio y sin fertilización química

nitrogenada). Las plantas control negativo se riegan con la solución R&P sin nitrato y las plantas control positivo se riegan con la solución R&P con nitrato (KNO₃ 0,4 g/l).

3.3.2. Ensayo de germinación

El protocolo seguido para la esterilización y escarificación de las semillas de retama, que presentan una cubierta dura que dificulta su germinación, es:

1. Hervir las semillas en agua durante 3 minutos (“activación” del embrión)
2. Escarificar sumergiendo las semillas en ácido sulfúrico concentrado 30 minutos
3. Lavar con agua abundante del grifo
4. Pase por alcohol 96% unos 20 segundos
5. Sumergir en lejía comercial diluida al 50% durante 10 minutos
6. Lavar con agua estéril 6 veces
7. Colocar las semillas en placas con Agar-Agua (1%) y mantenerlas en oscuridad hasta que la radícula se desarrolle de 1-3 cm

3.3.3. Infección de las semillas

Para realizar los tests de nodulación, las semillas germinadas con una radícula de 1-3 cm se infectan con la cepa deseada. Para ello, se siguen los siguientes pasos:

1. Crecimiento masivo de las cepas en placas de Petri con medio YMA
2. Preparación de los preinóculos en tubos con 5 ml de solución salina 0.9 % hasta generar una alta turbidez de 5 unidades MacFarland
3. Sumergir las semillas en la suspensión bacteriana durante al menos 20-25 minutos
4. Plantar las semillas inoculadas en conos forestales con vermiculita estéril. En el momento de la siembra se refuerza la inoculación añadiendo unos 0,6 ml del inóculo por semilla

3.3.4. Crecimiento de las plantas

Las bandejas con las semillas infectadas se incuban en una habitación acondicionada con tubos fluorescentes (tipo “cool daylight”) con unas condiciones de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. El tiempo de crecimiento es de 8-9 semanas. Cada semana, las plantas se riegan con la solución (diluida a la mitad) de R&P sin nitrato salvo las plantas control positivo que se riegan con R&P con nitrato.

3.3.5. Aislamiento de bacterias en los nódulos

Tras el periodo de crecimiento, se arrancan con cuidado las plantas y se observa si se han formado nódulos. Para comprobar que éstos últimos contienen la bacteria esperada, se elige al azar dos nódulos aparentemente activos (color rosado en su interior) de dos plantas al azar por cada cepa. Antes de triturar los nódulos para aislar el rizobio, se esteriliza su superficie siguiendo el siguiente protocolo:

1. Los nódulos se sumergen en alcohol al 96% durante 20 segundos
2. Se sumergen en lejía comercial diluida al 50% durante 4 minutos
3. Se realiza 6 lavados con agua
4. Introducir el nódulo con una pinza estéril en un tubo eppendorf con 50 µl de agua estéril. Se tritura el nódulo con un palillo estéril
5. Inocular 20 µl del triturado en una placa con medio YMA y se incuba a 28°C

3.4. Actividad ACC desaminasa

Para valorar esta actividad se utiliza el medio mínimo de Bergensen. Se preparan tres variantes del mismo: 1) un control positivo con NO₃K como fuente de nitrógeno; 2) un control negativo sin fuente de nitrógeno y 3) un medio donde el ACC es la única fuente de nitrógeno. Se preparan las placas para sembrar cada cepa en cada tratamiento por triplicado. El objetivo es comprobar si las bacterias son capaces de utilizar el ACC como fuente de nitrógeno, lo que sería sugestivo de que tienen la actividad ACC desaminasa. Para ello, se compara el tamaño y aspecto de las colonias en cada uno de los tres tipos de medios. Los preinóculos se prepararon en tubos de ensayos con 5 ml de solución salina al 0,9% estériles. Los tubos se inoculan con la cepa correspondiente hasta conseguir una turbidez de 0,5 en la escala McFarland. Por último, se siembran 5 µl del inóculo en la placa, y se incuban a 28°C hasta que se observa crecimiento en el control positivo.

4. Resultados y Discusión

4.1. Secuenciación y análisis filogenético

4.1.1. Filogenia del gen del ARN ribosómico 16S

En la Figura 1 se muestra la filogenia de todas las cepas aisladas de los nódulos de retama. Puede observarse que se obtuvieron bacterias pertenecientes a varios géneros: *Bradyrhizobium*, *Bosea*, *Neorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Agrobacterium*. Sin embargo, por su importancia cuantitativa, destacan dos grupos. Un grupo está formado por un conjunto de 12 cepas que se agrupan en una rama (BS 100%) con las especies del género *Bradyrhizobium* y otro que contiene 5 cepas que se incluyen dentro del género *Bosea* (100% BS). Dentro del gran *cluster* de *Bradyrhizobium* podemos diferenciar dos subgrupos de aislados, uno mayoritario que contiene 10 cepas que se agrupan en una subrama con la especie *Bradyrhizobium canariense* BTA-1^T (BS 61%), y otro que contiene dos aislados (SSUT-18 y SSUT-40) agrupados con la cepa *Bradyrhizobium*

genospecie alfa (cepa BC-C1) (BS 71%).

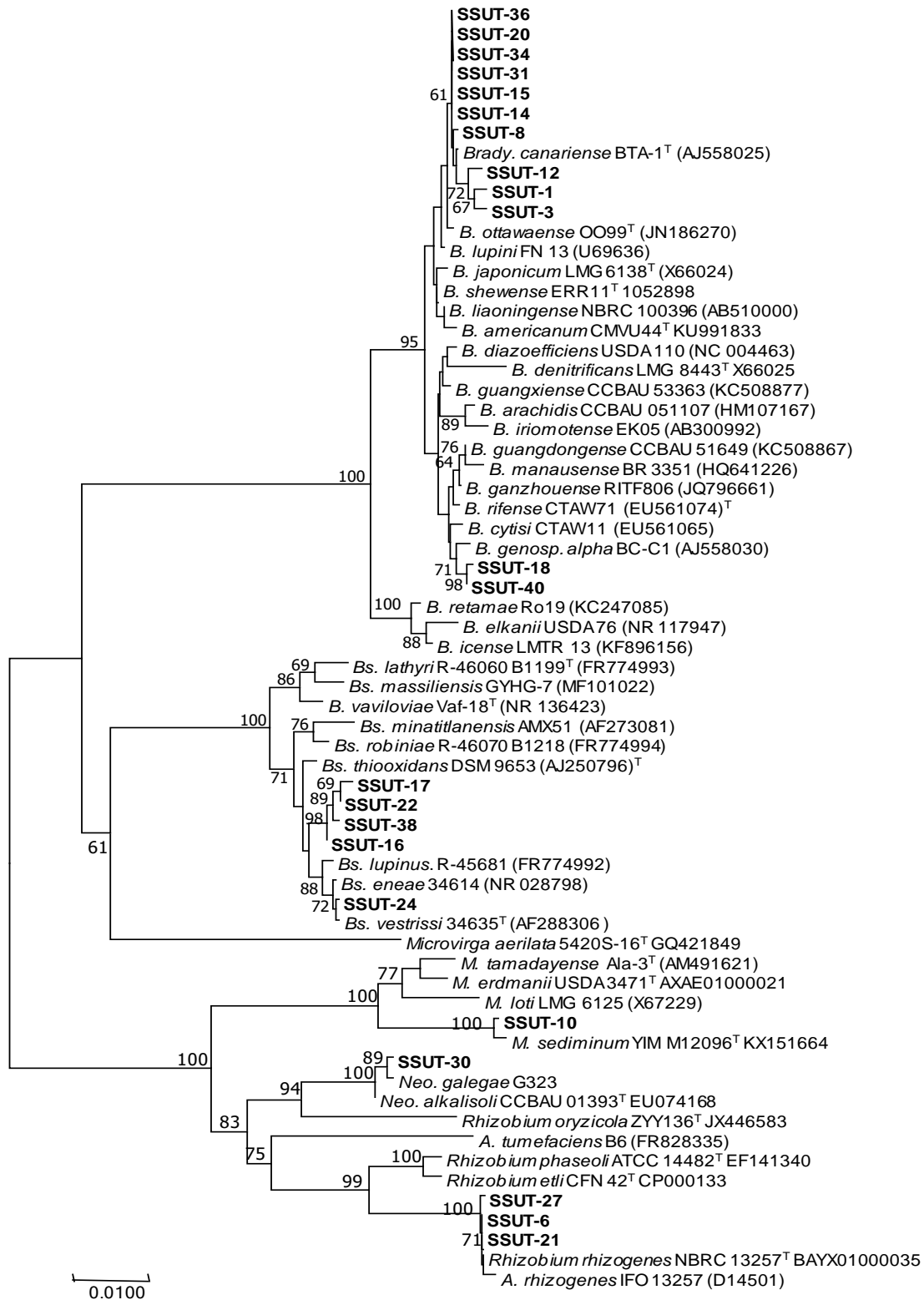


Figura 1. Árbol filogenético (NJ-k2p) basado en una secuencia parcial (1264 posiciones) del gen ribosómico 16S. Los números de los nodos muestran el porcentaje de apoyo de las ramas mediante el método bootstrap con 1000 réplicas (sólo se han incluido valores superiores al 60%). “B” representa al género *Bradyrhizobium*, “Bs” a *Bosa*, “Neo” a *Neorhizobium*, “M” a *Mesorhizobium* y “A” a *Agrobacterium*.

Hay que señalar que tanto la especie *B. canariense* como la genoespecie alpha se aislaron de otras leguminosas arbustivas endémica de Canarias (Vinuesa *et al.*, 2005). Mientras que la genoespecie alfa fue minoritaria, *B. canariense* fue la especie dominante encontrada en los nódulos radicales de dos subespecies de *Chamaecytisus proliferus* (el tagasaste y el escobón), de la especie *Teline stenopetala* y que los únicos 4 aislados de retama del Teide obtenido en ese estudio previo podrían también pertenecer a *B. canariense*. En el estudio de Vinuesa *et al.*, los aislados de retama fueron solo caracterizados por análisis de restricción del 16S, pero no se obtuvieron secuencias de estos aislados.

Las cepas caracterizadas en el presente trabajo, cuyas secuencias se agrupan en la rama con *B. canariense*, constituyen un grupo muy homogéneo, que muestran entre ellas una similitud entre el 99,5-100 % y que comparten con la cepa tipo de *B. canariense*, BTA-1, una similitud del 98,9-99,9 %. Aunque estos datos pueden apoyar que este grupo mayoritario de aislados de retama pertenecen a esta especie, hay que tener en cuenta que estos resultados no son concluyentes debido a que el grado de conservación de las secuencias 16S es muy grande para el género *Bradyrhizobium* y que nuestros aislados compartieron similitudes que alcanzaron hasta el 99,7 % con la especie *B. ganzhouense* y hasta un 99,8 % con la especie *B. ottawaense*. Estos resultados claramente ponen de manifiesto la limitación del gen 16S para discriminar entre especies próximas y la necesidad de secuenciar genes codificadores de proteínas que presenten tasas evolutivas mayores capaces de discriminar entre las especies más cercanas a nuestros aislados. Por otro lado, las cepas SSTU-18 y SSUT-40 son muy próximas entre ellas con un 99,9% de similitud y presentan similitudes con *B. canariense* entre el 98,9-99,1 % y el 98,8-99,1 % respectivamente. En consecuencia, aparecen en una subrama más alejadas de esta especie, y se agrupan con la genoespecie alpha con la que comparten una similitud del 99,5-99,6 %.

En la Figura 1, el grupo de 5 cepas de *Bosea* presentan una similitud entre ellas del 99,1-99,9 %, siendo los valores más bajos obtenidos con la cepa SSUT-24. En consecuencia, estas 5 cepas se separan en 2 clusters. El primero agrupa las cepas SSUT-16, 17, 22 y 38, que presentan las similitudes más altas con *Bs. thiooxidans* (99,3-99,6 %) y *Bs. Lupinus* (99,2-99,5 %), pero forma una línea evolutiva bien delimitada que no contiene especies de referencias. El segundo cluster está formado sólo por la cepa SSUT-24, y se coloca en una rama con otras 4 especies con las que presenta las similitudes más altas: *Bs. vestrissi* (99,9 %), *Bs. eneae* (99,8 %), *Bs. lupinus* (99,7 %) y *Bs. thiooxidans*

(99,3 %). Dado los altos valores de similitud obtenidos con varias cepas tipo, se hace necesario el análisis de otros genes más divergentes que puedan producir filogenias más resolutivas.

4.1.2. Filogenia del gen *recA* del género *Bradyrhizobium*

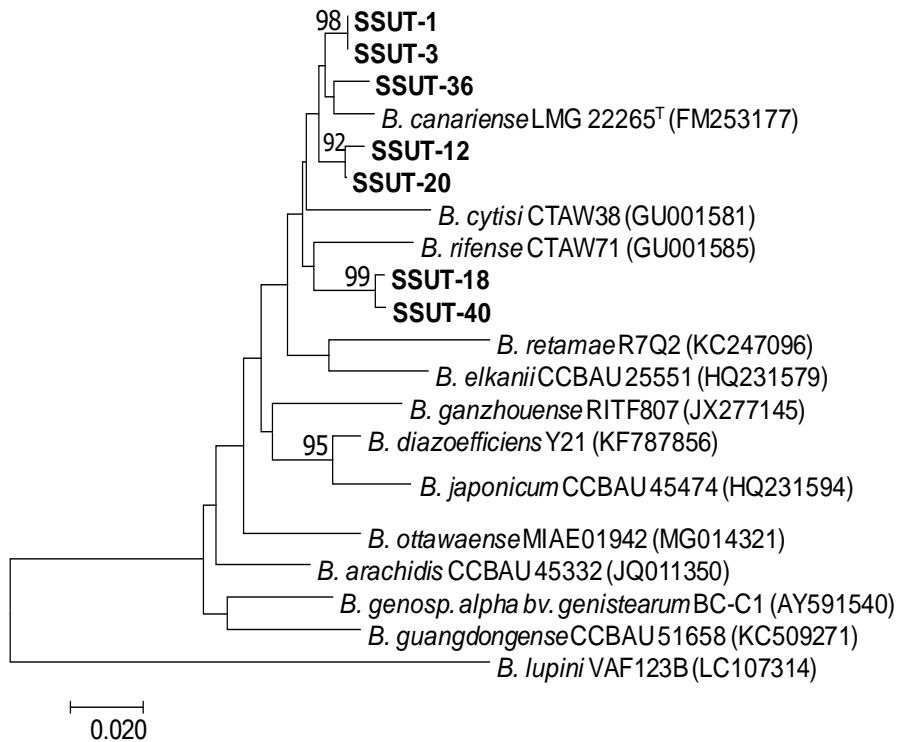


Figura 2. Árbol filogenético (NJ-k2p) basado en una secuencia parcial (354 posiciones) del gen *recA* para el género *Bradyrhizobium*.

El árbol filogenético basado en la secuencia *recA* del género *Bradyrhizobium* (Figura 2) es en general congruente con la filogenia ribosomal. Al igual que en el árbol del 16S, en el “cluster *B. canariense*”, las 7 cepas seleccionadas para este análisis forman un grupo homogéneo, aunque la rama no tiene apoyo estadístico debido a que el fragmento *recA* secuenciado presenta también similitudes relativamente altas con las especies *B. cytisi* y *B. rifense*, que ocupan una posición intermedia entre el grupo *B. canariense* y las cepas SSUT-18 y 40. La mayor diferencia con respecto a la filogenia del 16S se obtuvo para estas dos últimas cepas que aparecen en la filogenia de *recA* más cercanas a las especies *B. cytisis*, *B. rifense* que a la genoespecie alpha.

4.1.3. Filogenia del gen *glnII*

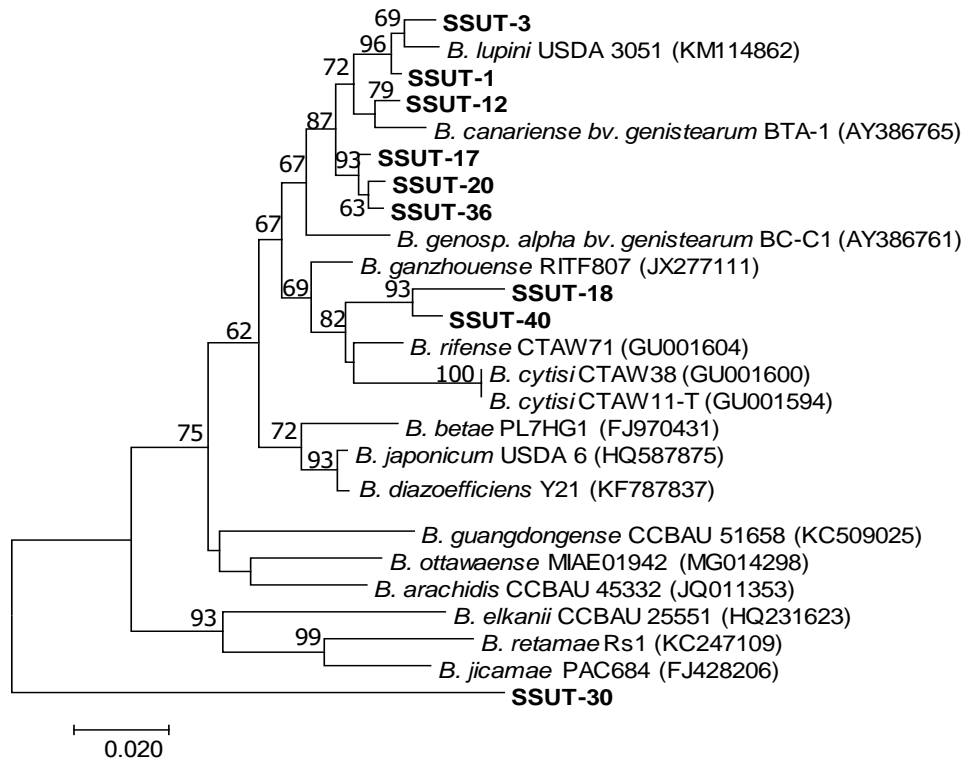


Figura 3. Árbol filogenético (NJ-k2p) basado en una secuencia parcial (441 posiciones) del gen *glnII* en el género *Bradyrhizobium*.

La filogenia de las secuencias del gen *glnII* (Figura 3) muestra congruencia con filogenias de secuencias 16S y de *recA* para el “cluster *B. canariense*”, ya que estas cepas forman un grupo homogéneo que se agrupa en una rama y que en este caso se ve apoyado por alto valor de BS (87%). Para las cepas SSUT-18 y SSUT-40, la filogenia de la *glnII*, discrepa de la filogenia ribosomal en que estas dos cepas no aparecen próximas a la genospecie alpha y coincide con la filogenia de *recA* al mostrar que estarían más relacionadas con *B. rifense* y *B. cytisi*.

4.1.4. Filogenia de los genes *recA* y *gyrB* del género *Bosea*

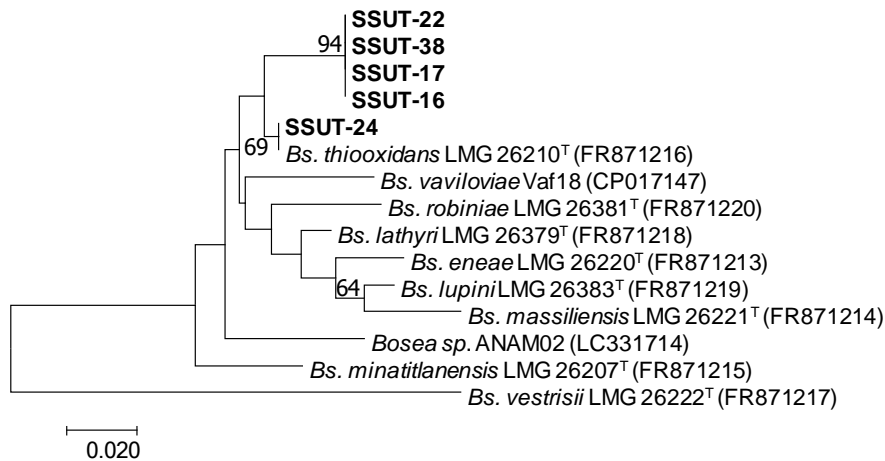


Figura 4. Árbol filogenético (NJ-k2p) basado en una secuencia parcial (174 posiciones) del gen *recA* para el género *Bosea*.

Para el género *Bosea*, las filogenias de las secuencias de los genes *housekeeping* *recA* y *gyrB* estuvieron de acuerdo entre ellas (Figuras 4 y Figura 5, respectivamente) y con la filogenia 16S en mostrar que el grupo constituido por las cepas SSUT-16, SSUT-22 y SSUT-38 (y posiblemente SSUT-17, aunque la secuencia de *gyrB* para esta cepa fue de mala calidad y no se pudo incluir en el árbol) forman una línea evolutiva bien diferenciada que no contiene cepas de referencia de ninguna de las especies de *Bosea* descritas hasta la fecha, lo que es compatible con el hecho que representan una nueva especie para este género. Por el contrario, en la filogenia de *recA* la cepa SSUT-24 aparece en una rama con la especie *Bs. thiooxidans*. Desafortunadamente, para esta cepa solo se obtuvo una secuencia de calidad con uno de los cebadores para el gen *gyrB*, por ello, debido a lo corto del fragmento obtenido, esta cepa no se incluyó en el árbol.

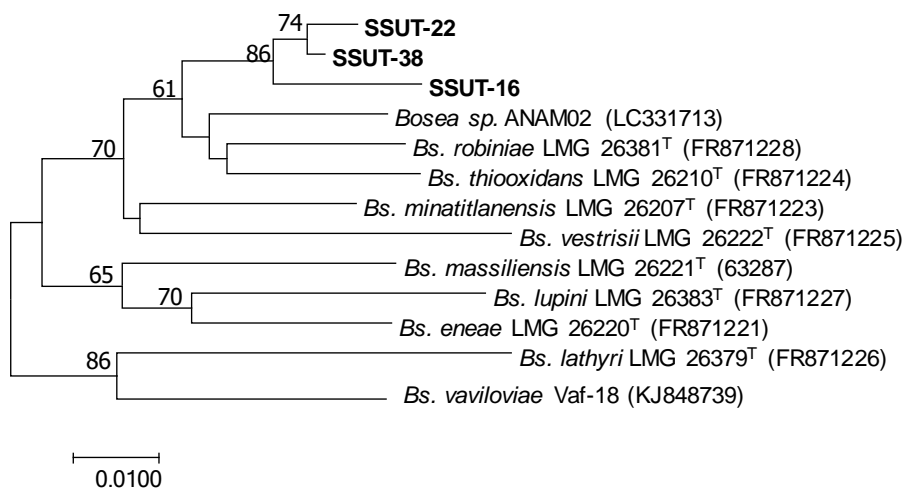


Figura 5. Árbol filogenético (NJ-k2p) basado en una secuencia parcial (390 posiciones) del gen *gyrB* en el género *Bosea*.

4.1.5. Filogenia de los genes concatenados

Por último, para reunir toda la información obtenida de las secuencias, se realizó un análisis de secuencias multilocus (MLSA), concatenando en una misma secuencia de los fragmentos obtenidos para los tres genes; 2041 nt (1246 nt del gen 16S + 354 nt del gen *recA* + 441 nt del gen *glnII*) para los *Bradyrhizobium* y 1810 nt (1246 nt del gen 16S + 174 nt del gen *recA* + 390 nt del gen *gyrB*) para *Bosea* (Figuras 6 y 7 respectivamente). Se puede observar que este tipo de análisis origina filogenias con un mayor poder de delimitación entre las especies próximas y se han obtenido árboles filogenéticos cuyas ramas tienen altos valores de *bootstrap*.

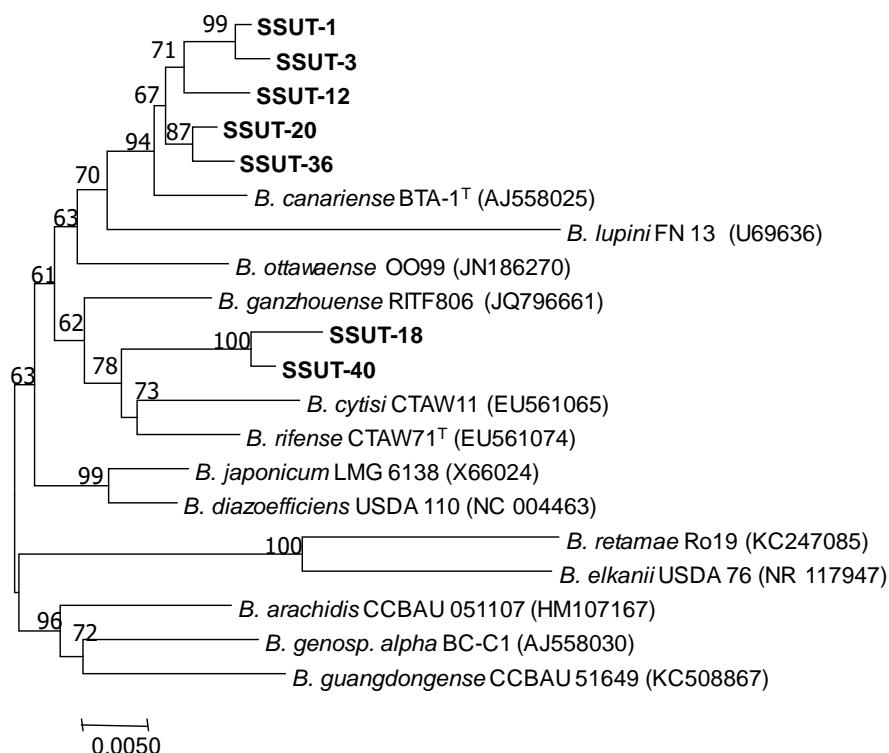


Figura 6. Árbol filogenético (NJ-k2p) basado en un concatenado de 3 genes (16S, *recA* y *glnII*) de un total de 2041 posiciones para el género *Bradyrhizobium*.

Así, en el género *Bradyrhizobium*, las cepas del “cluster *B. canariense*” forman un grupo homogéneo con valor de *bootstrap* del 94 % con la especie *B. canariense*, lo que sumado a los altos porcentajes de identidad de estas cepas con *B. canariense*, 98,0-98,8 % para los tres genes, claramente apoya que las cepas aisladas de retama pertenecen a esta especie. Hay que tener en cuenta que en los análisis MLSA, cepas con una similitud por encima del 96 % se suele considerar de la misma especie (aunque normalmente se recomienda utilizar al menos 5 genes *housekeeping* en un análisis concatenado). El análisis de MLSA descarta completamente que nuestros rizobios de retama pertenezcan

a la especie *B. ottawaense*, a pesar de la relación cercana que presentan en la filogenia del 16S.

En cuanto a las cepas SSUT-18 y 40, el porcentaje de identidad entre ambas, por encima del 99 %, indica que son cepas de una misma especie. La filogenia del MLSA, sin embargo, no confirma la relación cercana de estas dos cepas con la genoespecie alpha como indicaba la secuencia 16S, sino que, por el contrario, SSUT-18 y 40 tienen como especies más cercanas a *B. cytisi* y *B. rifense*. Aunque el porcentaje de identidad de estos dos aislados con estas dos especies es relativamente alto (97,3-97,9 %) para los genes secuenciados, su posición en una rama bien diferenciada indica que SSUT-18 y SSUT-40 es un nuevo linaje y que posiblemente este linaje representa una especie nueva.

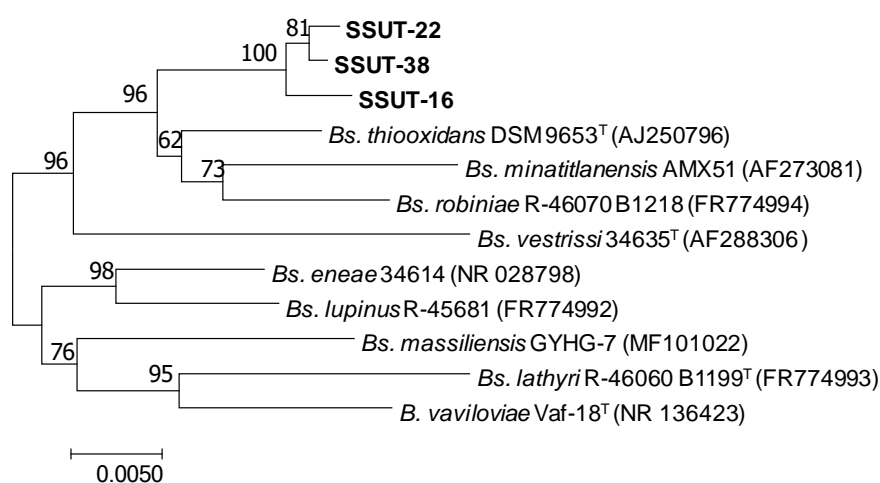


Figura 7. Árbol filogenético (NJ-k2p) basado en un concatenado de 3 genes (16S, recA y gyrB) de un total de 1810 posiciones para el género *Bosea*.

Para el género *Bosea*, el árbol de MLSA (Figura 7), indica que la posición que ocupan las cepas SSUT-16, 22 y 38 es compatible con una nueva especie cuyas especies más cercanas son *Bs. thiooxidans*, *Bs. minatitlanensis* y *Bs. robiniae*.

4.2. Test de Nodulación

Tras un periodo de crecimiento de 8 semanas, las plantas se arrancaron y se tomaron los siguientes datos: número de nódulos por planta, longitud de la parte aérea, longitud de la raíz, peso fresco de la parte aérea, peso fresco de la raíz, peso seco de la parte aérea y contenido en nitrógeno de la parte aérea (hay que señalar que estos últimos datos no se pudieron incluir en esta memoria ya que en el servicio de análisis del IPNA, CSIC, hubo un error en la rotulación de las muestras).

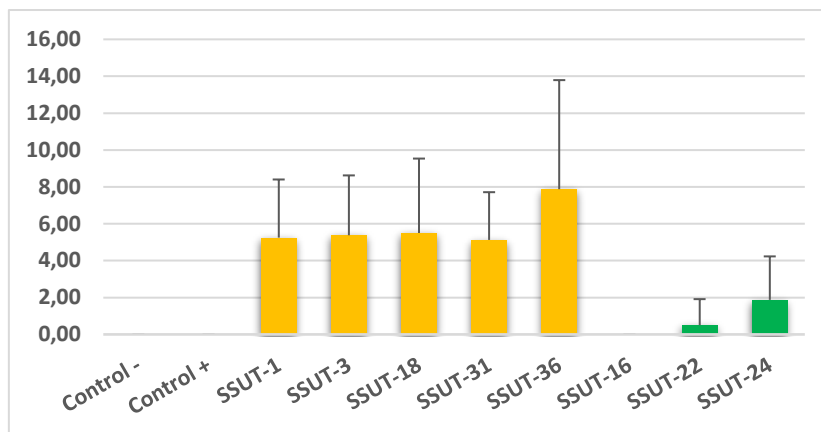


Figura 8. Número de nódulos de las plantas ocho semanas después de ser sometidas a los distintos tratamientos (distintas cepas diferenciados por colores).

Las plantas control (positivo y negativo), como cabía esperar, no presentan nódulos, (Figura 8). En las plantas inoculadas con *Bosea*, ninguna de las réplicas inoculadas con la cepa SSUT-16 presentó nódulos. Algunas plantas inoculadas con la cepa SSUT-22 y SSUT-24 presentaron algunos nódulos y se descartaron (tras comprobar que eran contaminaciones) para el resto de los análisis. Por otro lado, todas las plantas inoculadas con las cepas del grupo *Bradyrhizobium* tanto de *B. canariense* (SSUT-1, SSUT-3, SSUT-31, y SSUT-36) como la cepa SSUT-18, presentan nodulación, con un número de nódulos con medias entre 5 y 8 (Figura 8). La cepa SSUT-36, como puede verse en la figura es la que presentó el mayor número de nódulos por planta.

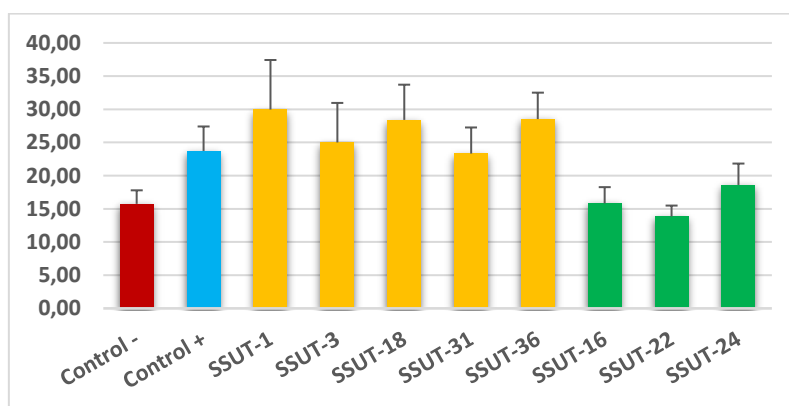


Figura 9. Longitud de la parte aérea de las plantas ocho semanas después de someterlas a los distintos tratamientos (diferenciados por colores).

El crecimiento de la parte aérea (Figura 9) es mayor en las plantas inoculadas con las cepas de *Bradyrhizobium* que con las de *Bosea*, lo que claramente está de acuerdo con los datos de nodulación. Además, es de destacar que las plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* superan la longitud de las plantas control positivo (suplementadas con

fertilización química de N a partir de la solución R&P), mientras que las plantas inoculadas con *Bosea* presentan una longitud similar a la longitud de las plantas control negativo (sin N), lo que se relaciona con su incapacidad para nodular y fijar nitrógeno.

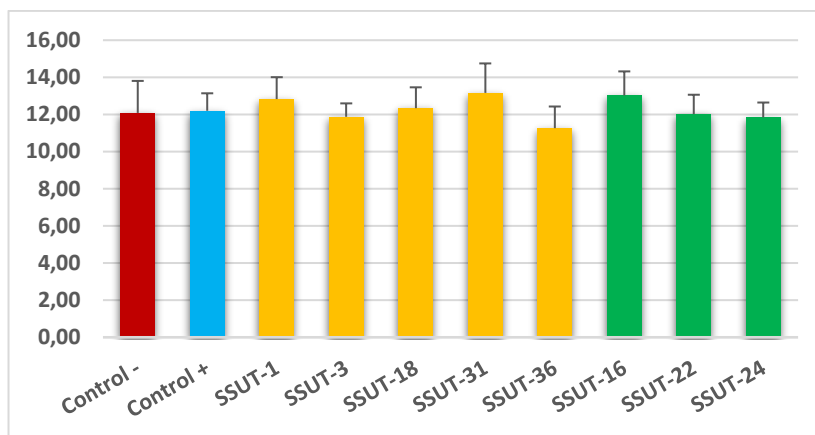


Figura 10. Longitud de la raíz de las plantas ocho semanas después de someterlas a distintos tratamientos (diferenciados por colores).

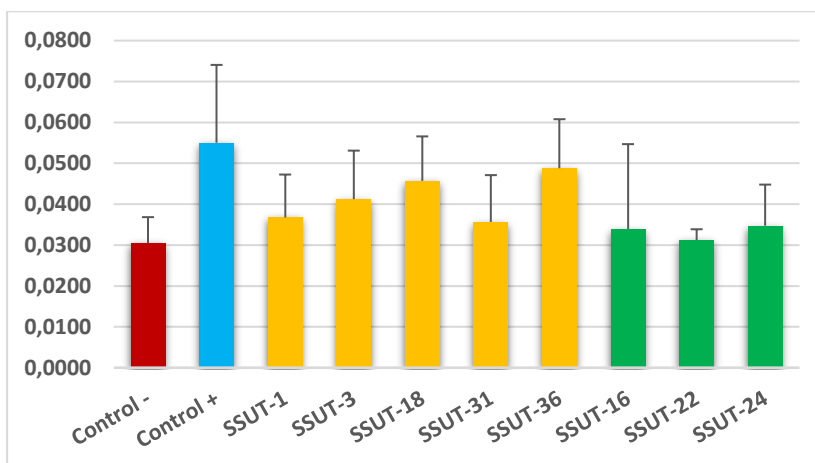


Figura 11. Peso fresco de la raíz de las plantas ocho semanas después de someterlas a distintos tratamientos (diferenciados por colores).

La inoculación con las bacterias no tuvo efecto sobre el desarrollo en longitud de la raíz, ya que como se observa en la Figura 10, en todos los tratamientos se obtuvieron resultados muy similares entre sí, con plantas que tienen raíces con longitudes entre 11,00 y 14,00 cm. En cuanto a los resultados del peso fresco de las raíces (Figura 11) tampoco se observan grandes diferencias entre tratamientos, aunque cabe destacar el mayor peso de las plantas control positivo y el menor en el control negativo. Respecto a las plantas inoculadas con *Bradyrhizobium*, tienen pesos menores que los de control positivo, pero mayores que las plantas con *Bosea*.

Por último, los resultados para la parte aérea, en peso fresco y seco son congruentes entre sí (Figuras 12 y 13, respectivamente).

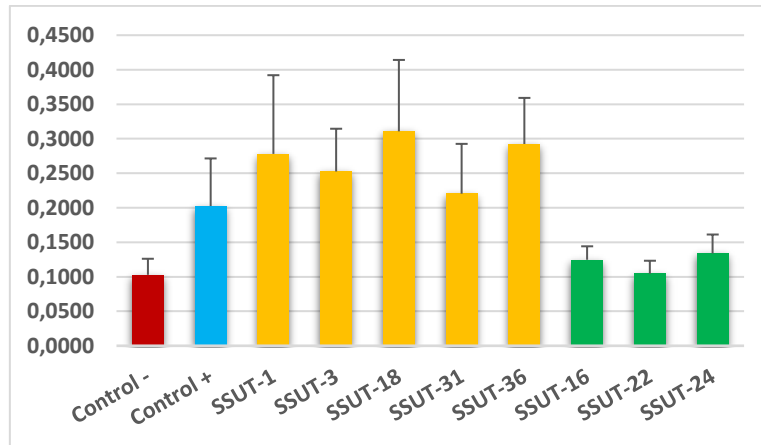


Figura 12. Peso fresco de la parte aérea de las plantas ocho semanas después de someterlas a distintos tratamientos (diferenciados por colores).

Así, las plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* son las que tienen mayor peso, incluso superan el control positivo con nitrato. Mientras que, como cabía esperar en vista de los resultados de nodulación, las plantas tratadas con *Bosea* presentan un peso de la parte aérea similar a las plantas control negativo. Entre las cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*, la cepa SSUT-18 fue la que presentó el peso más alto, seguida luego por las cepas SSUT-36 y SSUT-1.

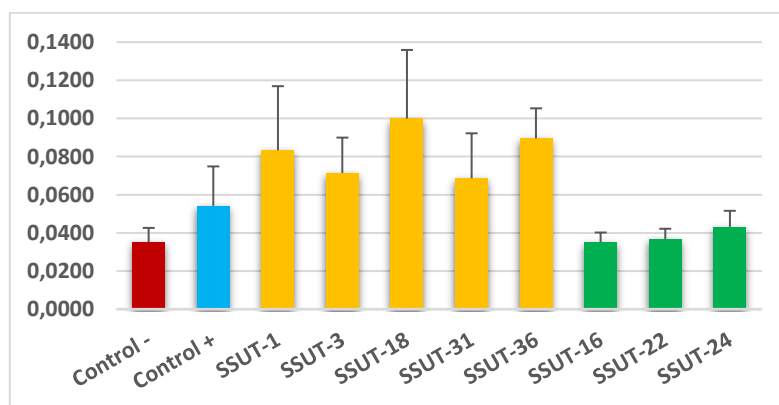


Figura 13. Peso seco de la parte aérea de las plantas ocho semanas después de someterlas a distintos tratamientos (diferenciados por colores).

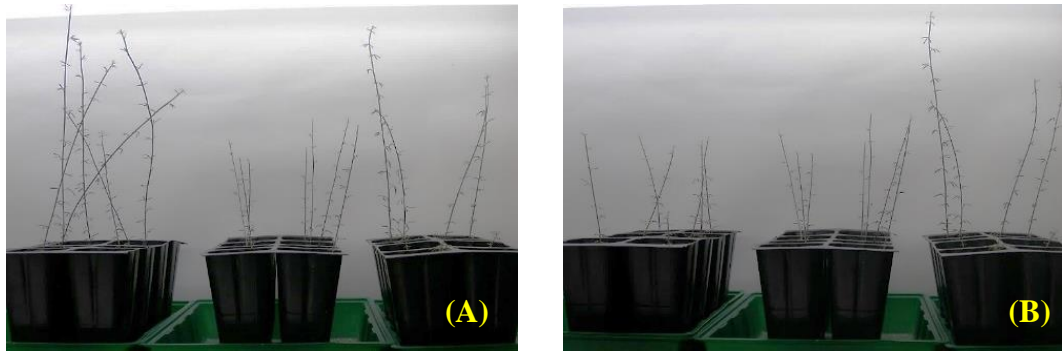


Figura 14. (A) de izquierda a derecha: SSUT-1 (*Bradyrhizobium*), control (-) y control (+); (B) de izquierda a derecha: SSUT 22 (*Bosea*), control (-) y control (+).

4.3. Actividad ACC desaminasa

Los resultados obtenidos para la actividad de la ACCd no fueron concluyentes debido a las escasas diferencias observadas entre los controles positivos y negativos. Esto puede deberse a que se usaron sales que no tenían el grado de pureza necesario para este tipo de experimento. En efecto, algunos componentes usados en el medio Bergensen no son completamente puros y pueden presentar trazas de nitrógeno que podrían utilizar las bacterias (ejemplo, el $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ contiene 0,001% y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,005% de N). Aunque no se obtuvieron claras diferencias entre tratamientos, e incluso en varios casos el crecimiento en medios con KNO_3 presentaban diámetros similares o incluso ligeramente menores que los inóculos de los medios sin N, sin embargo, en muchas de las placas se observó que la zona de crecimiento cambiaban su morfología, consistencia o color entre los distintos medios (con N, sin N y con ACC), y los crecimientos en los medios con KNO_3 presentaban una mayor biomasa aparente (más densas) que en los medios sin N. Con respecto a las bacterias crecidas en las placas con ACC como única fuente de nitrógeno, los ejemplos más claros de una posible actividad ACCd se encontró en las cepas SSUT-4, SSUT-16, SSUT-21 y SSUT-22 que parecieron superar ligeramente al control negativo. En la Figura 15 (A, B y C) se muestra marcada la cepa SSUT-4 creciendo en los tres tipos de medios.

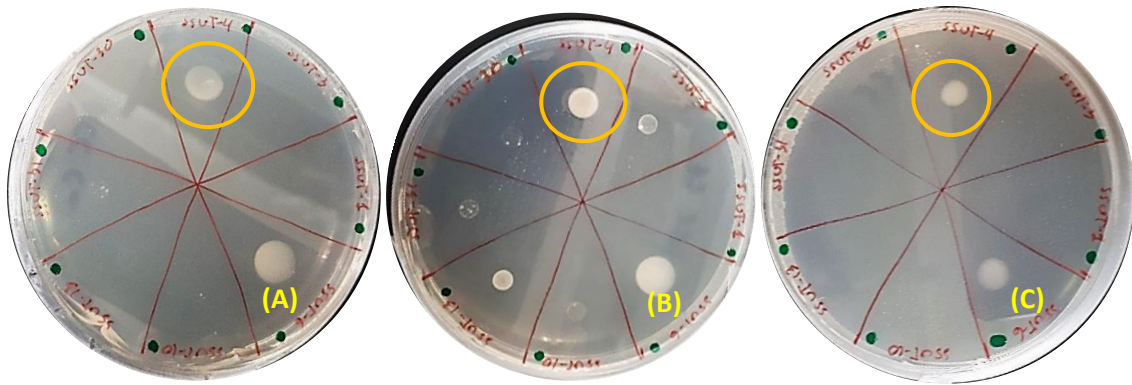


Figura 15: (A) Medio control negativo; (B) Medio control positivo; (C) Medio con ACC

5. Conclusiones

1. *Spartocytisus supranubius* está nodulada predominantemente por bacterias del género *Bradyrhizobium*.
2. Bacterias del género *Bosea* fueron cuantitativamente el segundo género más importante de aislados de los nódulos de la retama del Teide.
3. Los análisis filogenéticos basados en las secuencias del gen del ARNr16S y de los genes *housekeeping recA* y *glnII* indicaron que el grupo mayoritario de aislados del género *Bradyrhizobium* pertenecen a la especie *B. canariense*, mientras que otro grupo formado por dos cepas (SSUT-18 y SSUT-40) representan una nueva especie para este género.
4. Los aislados del género *Bosea*, se distribuyen igualmente en todos los análisis filogenéticos en dos ramas. Una de ellas incluye sólo a la cepa SSUT-24 que se agrupa con otras especies ya descritas y serán necesarios otros análisis para determinar a cuál de ellas pertenece. Por el contrario, las otras 4 cepas de *Bosea* (SSUT-16, SSUT-17, SSUT-22 y SSUT-38) en todas las filogenias se colocan en una rama claramente separada de todas las especies actualmente descritas de este género lo que apoya que son una nueva especie para el género *Bosea*.
5. Los tests de nodulación indicaron que los aislados del género *Bradyrhizobium* formaron nódulos eficaces, lo que se deduce del aspecto rosado de los mismos y por el tamaño y aspecto verde de las plantas. Dentro de este género, las plantas inoculadas con la cepa SSUT-18 es la que presentó mayor biomasa en peso fresco y seco, y por lo tanto la de mayor eficacia simbiótica.

6. Las cepas del género *Bosea* fueron incapaces de reinfectar a su hospedador original, sugiriendo que son endófitos y no verdaderos rizobios fijadores simbióticos de nitrógeno.

Conclusions

1. *Spartocytisus supranubius* is predominantly nodulated by bacteria of the genus *Bradyrhizobium*.
2. Bacteria belonging to the genus *Bosea* were quantitatively the second most important isolated genus of the nodes of the Teide broom.
3. Phylogenetic analyzes based on the sequences of the rRNA 16S gene and the housekeeping *recA* and *glnII* genes indicated that the majority of isolates of genus *Bradyrhizobium* belong to the species *B. canariense*, while another group consisting of two strains (SSUT-18 and SSUT-40) represent a new species for this genus.
4. The isolates of genus *Bosea* are distributed in two branches in all phylogenetic analyzes. One of them includes only the strain SSUT-24 that grouped with other already previously described species and it will be necessary other analyses to determine to which one it belongs. On the other hand, the other 4 strains of *Bosea* (SSUT-16, SSUT-17, SSUT-22 and SSUT-38) are placed in all the phylogenies on a clearly separated branch from all currently recognized species of this genus, which supports that this group represent a new species for the genus *Bosea*.
5. Nodulation tests indicated that all isolates from genus *Bradyrhizobium* formed effective nodules, what is deduced from their pink colour as well as by the appearance and greenness of the plants. Within this genus, the plants inoculated with the SSUT-18 produced the highest biomass in fresh and dry weight, and therefore this strain has the highest symbiotic efficiency.
6. Strains of the genus *Bosea* were unable to reinfect their original host, *S. supranubius*, suggesting that they are endophytes and not true symbiotic nitrogen fixation rhizobia.

6. Bibliografía

- Antoun, H. (2013). Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, (June 2009), 353–355. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01169-4>
- Calvo, S. G. (2011). Bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno. *Universidad de Salamanca*, 3, 173–186.
- David, M., Daveran, M. L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., ... Kahn, D. (1988). Cascade regulation of nif gene expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell*, 54(5), 671–683. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(88\)80012-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(88)80012-6)
- De Meyer, S. E., & Willems, A. (2012). Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupini* sp. nov., *Bosea lathyri* sp. nov. and *Bosea robiniae* sp. nov., isolated from legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(10), 2505–2510. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.035477-0>
- Dixon, R., & Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 621–631. <https://doi.org/10.1038/nrmicro954>
- Durán, D., Rey, L., Sánchez-Cañizares, C., Jorrín, B., Imperial, J., & Ruiz-Argüeso, T. (2013). Biodiversity of Slow-Growing Rhizobia. *Beneficial Plant-Microbial Interactions*, (July), 21–46. <https://doi.org/10.1201/b15251-3>
- Garrity et al., (Ed). (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Ed. Vol.2: The Proteobacteria, parts A, B, C. Springer, New York
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*, 169(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.009>
- Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Saqlan, S. M., & Rasheed, M. (2009). Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. *Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 1(1), 48–58. <https://doi.org/10.5923/j.re.20120201.10>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Kyncl, T., Suda, J., Wild, J., Wildová, R., & Herben, T. (2006). Population dynamics and clonal growth of *Spartocytisus supranubius* (Fabaceae), a dominant shrub in the alpine zone of Tenerife, Canary Islands. *Plant Ecology*, 186(1), 97–108. <https://doi.org/10.1007/s11258-006-9115-6>
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Fijación biológica de nitrógeno. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1–20.
- Menna, P., Barcellos, F. G., & Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of Bradyrhizobium strains based on multilocus sequence analysis of the 16S rRNA gene, ITS region and glnII, recA, atpD and dnaK genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(12), 2934–2950. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.009779-0>
- Penrose, D. M., & Glick, B. R. (2003). Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 10–15. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00086.x>
- Pérez-Yépez, J., Armas-Capote, N., Velázquez, E., Pérez-Galdona, R., Rivas, R., & León-Barrios, M. (2014). Evaluation of seven housekeeping genes for multilocus sequence analysis of the genus *Mesorhizobium*: Resolving the taxonomic affiliation of the *Cicer canariense* rhizobia. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(8), 553–559. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.10.003>
- Rincón, A., Arenal, F., González, I., Manrique, E., Lucas, M. M., & Pueyo, J. J. (2008). Diversity of rhizobial bacteria isolated from nodules of the gypsophyte *Ononis tridentata* L. growing in Spanish soils. *Microbial Ecology*, 56(2), 223–233. <https://doi.org/10.1007/s00248-007-9339-6>
- Safronova, V. I., Kuznetsova, I. G., Sazanova, A. L., Kimeklis, A. K., Belimov, A. A., Andronov, E. E., ... Tikhonovich, I. A. (2015). *Bosea vaviloviae* sp. nov., a new species of slow-growing rhizobia

isolated from nodules of the relict species *Vavilovia formosa* (Stev.) Fed. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 107(4), 911–920. <https://doi.org/10.1007/s10482-015-0383-9>

- Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., ... 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 Brady. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 569–575. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63292-0>
- Wang, L. T., Lee, F. L., Tai, C. J., & Kasai, H. (2007). Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(8), 1846–1850. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64685-0>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697–703. <https://doi.org/n.a>.
- Wheeler, C. T., & Dickson, J. H. (1990). Symbiotic nitrogen fixation and distribution of *Spartocytisus supranubius* on Las Canadas, Tenerife. *Revista Vieraea*.
- Year, C., Holder, C., Name, F., & Name, G. (2011). *Metadata of the chapter that will be visualized online. Media* (Vol. 599). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-02904-7>