

Fijación Biológica de Nitrógeno en el Parque  
Nacional del Teide:  
Simbiosis *Spartocytisus supranubius*- Rizobios

Biological Nitrogen Fixation in Teide National  
Park: Symbiosis *Spartocytisus supranubius*-  
Rhizobia

**Trabajo de Fin de Grado**

Laura María Pulido Suárez

Tutorizado por Milagros León Barrios y Juana María González Mancebo

Grado en Biología. Julio 2017

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	2
1.1 Fijación biológica de nitrógeno.....	2
1.2 Bacterias fijadoras de nitrógeno .....	2
1.3 El ecosistema de las Cañadas del Teide .....	4
2. OBJETIVOS .....	5
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	6
3.1 Suelos .....	6
3.2 Medios de cultivo .....	6
3.3 Valoración del contenido en nitrógeno de los suelos .....	7
3.4 Material vegetal.....	7
3.5 Aislamiento de rizobios y cálculo del NMP.....	9
3.6 Experimentos de reinfeksi3n de los rizobios aislados.....	11
3.7 Ensayo de la actividad ACC desaminasa .....	11
3.8 Extracci3n de ADN gen3mico .....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSI3N.....	15
4.1 Ensayos de germinaci3n.....	15
4.2 Contenido de nitr3geno .....	16
4.3 N3mero m3s probable .....	17
4.4 Ensayo de la actividad ACC desaminasa .....	18
4.5 Ensayos de reinfeksi3n de los rizobios aislados.....	19
4.6 Perfiles M13 RAPD .....	20
4.7 Secuenciaci3n del gen del ARNr 16S .....	21
5. CONCLUSIONES .....	26
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28
ANEXO 1. Tabla de cepas SSUT aisladas de n3dulos de retama .....	30

## RESUMEN

La Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) es un proceso donde el dinitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) es reducido a amonio por la acción de microorganismos procariotas siendo la principal entrada de nitrógeno combinado a los ecosistemas. Entre estos microorganismos destacan los “rizobios”, que fijan el nitrógeno en simbiosis con plantas de la familia *Leguminosae*. El propósito de este trabajo fue estudiar la simbiosis entre rizobios y la retama del Teide (*Spartocytisus supranubius*), una leguminosa endémica amenazada, posiblemente por acción del conejo (*Oryctolagus cuniculus*). Como leguminosa dominante en Las Cañadas del Teide, su retroceso podría tener consecuencias negativas en la entrada de nitrógeno al ecosistema. En este trabajo se recogieron muestras de suelos en la rizosfera de retama (con y sin presencia de letrina) y suelos control (sin plantas, con y sin letrina). Se valora el contenido en nitrógeno total y el número de rizobios en cada suelo y se analiza la diversidad genética (perfiles RAPD) y filogenética (secuenciación del ADN ribosómico 16S) en una colección de bacterias aisladas de los nódulos radicales. Los resultados muestran diferencias importantes en los aspectos estudiados en función de la presencia o ausencia de leguminosas y herbívoros.

## ABSTRACT

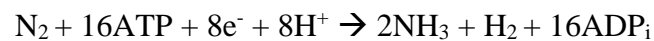
Biological Nitrogen Fixation (BNF) is a process carried out by a certain group of prokaryotic microorganisms where the atmospheric nitrogen ( $N_2$ ) is reduced to ammonia, and it constitutes the main source of combined nitrogen in the ecosystems. Within this group, stands out “rhizobia”, which fix nitrogen in symbiosis with plants of the *Leguminosae* family. The aim of this project was to study the symbiosis between rhizobia and retama del Teide (*Spartocytisus supranubius*), an endemic shrub legume currently endangered, probably due to the influence of rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). Being the dominant legume in Las Cañadas, its decline could have negative consequences in the ecosystem’s nitrogen supply. In this project we used soils from the broom’s rhizosphere (both with and without latrine) as well as soils without plants (also with and without latrine). The total nitrogen content was analysed in addition to the amount of rhizobia in each soil. Additionally, selected strains isolated from radical nodules were used to perform genetic (RAPD profiles) and phylogenetic diversity (sequencing of the DNAr 16S) analyses. The results show important differences among the different soils’ types, depending on the presence or absence of latrines.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

El nitrógeno es uno de los elementos imprescindibles para la vida. En el caso concreto de las plantas, es el principal elemento limitante tras el agua. Sin embargo, a pesar de que paradójicamente el nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) es muy abundante en la atmósfera (constituyendo un 78% de la misma) no puede ser utilizado directamente por los seres vivos, a excepción de un grupo diverso de microorganismos, todos de organización procariótica, conocidos como diazotrofos. La fijación del nitrógeno es un proceso en el que el dinitrógeno de la atmósfera se reduce hasta amonio. Este es un proceso fundamental, ya que proporciona una forma útil de nitrógeno para los seres vivos y constituye la principal entrada de nitrógeno en los ecosistemas, compensando las pérdidas que continuamente se producen en los mismos.

Aunque la fijación del dinitrógeno puede ocurrir abióticamente (tormentas eléctricas, vulcanismo, etc), la mayor parte del nitrógeno fijado tiene un origen biológico y, por ello, se conoce como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Los procariotas diazotóficos son capaces de realizar la FBN debido a que poseen un complejo enzimático conocido como nitrogenasa, la cual les permite realizar una reacción altamente endergónica que puede resumirse en la siguiente ecuación:



La relevancia para los ecosistemas de la FBN en comparación con la abiótica es clara, ya que se estima que fija entre 139 y 175 (Zahran *et al.*, 1999) de las 275 millones de toneladas fijadas globalmente al año (Galloway *et al.*, 2003).

## 1.2 BACTERIAS FIJADORAS DE NITRÓGENO

La FBN es llevada a cabo tanto por bacterias de vida libre como por bacterias simbióticas. Los procariotas de vida libre son muy diversos y pertenecen a diferentes grupos filogenéticos, incluyendo  $\gamma$ -proteobacterias (como *Azotobacter*, el primer género de bacteria diazotrofa de vida libre descubierto),  $\alpha$ -proteobacterias (*Azospirillum* o *Beijerinckia*), algunas especies de *Clostridium* (Phylum *Firmicutes*) e incluso especies de algunos géneros de *Archaea*, como *Methanococcus*.

### 1.2.1 GRUPO “RIZOBIO” Y SU SIMBIOSIS CON LAS LEGUMINOSAS

Algunos diazotrofos son incapaces de fijar el nitrógeno en vida libre y sólo pueden hacerlo en simbiosis con plantas. Este es el caso de un grupo de bacterias Gram negativas del suelo que fijan el N<sub>2</sub> en simbiosis con plantas de la familia *Fabaceae* o *Leguminosae*. Estos fijadores simbiotes se conocen con el nombre general de “rizobio” y son capaces de inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno sólo en las raíces de plantas leguminosas (con alguna excepción, como ciertos bradirizobios que fijan con *Parasponia*, una *Ulmaceae*).

La simbiosis rizobio-leguminosa es un proceso muy complejo y específico. El intercambio de señales entre ambos simbiotes permite el reconocimiento y la expresión de los genes de nodulación (genes *nod*, *nol*) que llevará a la infección de la raíz por parte del rizobio. El proceso culminará con la formación de una estructura conocida como nódulo radical, donde el rizobio se diferencia a bacteroide, expresando entonces los genes simbióticos de fijación (genes *fix* y *nif*). Se sintetizará ahora la enzima nitrogenasa, responsable de la reducción del nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) hasta amonio.

Cuantitativamente la FBN en los nódulos radicales de las leguminosas es la responsable de un cuarto del N<sub>2</sub> total fijado anualmente en nuestro planeta.

La taxonomía de los rizobios ha sufrido grandes cambios derivados principalmente de los datos obtenidos de las secuencias del gen del ARN ribosómico 16S y de las reconstrucciones de su filogenia. Actualmente los rizobios se agrupan en 14 géneros de *Proteobacteria*, principalmente de la clase  $\alpha$ -proteobacteria, aunque algunos géneros de  $\beta$ -proteobacteria incluyen también especies fijadoras de nitrógeno (Berrada *et al.*, 2014). En particular, los géneros que podríamos considerar los rizobios “clásicos”, *Rhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Mesorhizobium* y *Bradyrhizobium* son todos  $\alpha$ -proteobacteria y son, desde luego, los géneros que incluyen la mayor parte de las especies fijadoras de nitrógeno, que actualmente sobrepasan las 100 especies (<https://www.rhizobia.co.nz/>). Cabe resaltar especialmente el caso del género *Bradyrhizobium*, donde el número actual de especies es de 34, de las cuales 22 se han descrito en los años 2014-2016 (<https://www.bacterio.net>).

Además de fijar el nitrógeno atmosférico, también se ha descrito en diversas especies de rizobios otras propiedades promotoras del crecimiento vegetal, englobándose dentro del grupo de Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR en sus siglas en inglés), al favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas, tanto directa como indirectamente (Mayak *et al.*, 2004). En concreto, muchos PGPR producen la enzima 1-aminociclopropano

desaminasa (ACCd), que degrada el ACC, un precursor del etileno. Esta hormona gaseosa se libera en respuesta al estrés abiótico y biótico, y cuando sus niveles se mantienen elevados sus efectos se vuelven negativos al producir senescencia, clorosis y abscisión, inhibiendo el crecimiento de la planta. La actuación de la ACCd disminuye los niveles de esta hormona, de tal manera que el vegetal recupera su correcto desarrollo (Glick, 2014). Por tanto, los rizobios no sólo proporcionan nitrógeno útil para las plantas, sino que además pueden liberar sustancias que favorezcan su crecimiento.

Si tenemos en cuenta que *Fabaceae* es una de las mayores y más diversas familias de angiospermas con más de 19000 especies, y que muchas de ellas tienen gran interés comercial y alimentario (soja, guisantes, garbanzos, lentejas o judías), es evidente que la FBN, además de su importantísimo papel ecológico ya comentado, tiene también un enorme interés económico, ya que permite el cultivo de algunas leguminosas en suelos deficientes en nitrógeno. La FBN, por lo tanto, hace innecesario el aporte de abonos químicos nitrogenados, que añadidos en exceso son altamente contaminantes para el medio ambiente y, además, perjudiciales para la salud.

### **1.3 EL ECOSISTEMA DE LAS CAÑADAS DEL TEIDE**

La retama del Teide (*Spartocytisus supranubius* Christ ex G. Kunkel) es una especie endémica de las cumbres de Tenerife y La Palma, siendo la leguminosa dominante de la vegetación de la alta montaña canaria. En Tenerife esta especie se distribuye a lo largo de las Cañadas, en el Parque Nacional del Teide, creciendo entre los 1700-3000 m (Vogenraiter, 1975). Debido a su elevada altitud, las condiciones climáticas suelen ser extremas (clima continental subalpino), presentando una alta diurnalidad, alta insolación y bajas precipitaciones, por lo que la vegetación está adaptada a estas duras condiciones. En el caso de la especie que nos ocupa, se trata de una leguminosa arbustiva, que puede llegar a los 2-3 m de altura (Kyncl *et al.*, 2006), muy ramificada y de hojas pequeñas y caducas, asumiendo el tallo el papel fotosintetizador. Presenta, además, raíces pivotantes. De flores blancas, tras la fecundación se forma una legumbre negra, algo vellosa, con 4-6 semillas en su interior (Bramwell y Bramwell, 2001) y con semillas duras, lo que dificulta su germinación y hace necesario un tratamiento de escarificación antes de trabajar con ellas.

Al igual que muchas otras leguminosas, *S. supranubius* es capaz de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con rizobios, desarrollando nódulos en sus raíces. El contenido en nitrógeno del suelo en las Cañadas es muy bajo (Arbelo *et al.*, 2009), y se ha

puesto en evidencia que la concentración de este elemento es superior en zonas alrededor de retama, especialmente de ejemplares jóvenes (Wheeler y Dickson, 1990). Asimismo, la única descripción de rizobios de *S. supranubius* son las caracterizaciones parciales de 5 cepas (Jarabo-Lorenzo *et al.*, 2000), posteriormente identificados como *Bradyrhizobium canariense* (Vinuesa *et al.*, 2005). Se trata, por tanto, de una simbiosis poco estudiada.

En la actualidad esta especie se encuentra protegida debido al detrimento progresivo de sus poblaciones, siendo frecuente encontrar ejemplares con signos de pérdida de vitalidad, daños de distinta consideración, decrepitud, gran cantidad de copa muerta e individuos secos (Seguimiento del estado fitosanitario de las masas forestales en la red de Parques Nacionales, 2011). Es más, el principal problema al que se enfrenta esta especie es la falta de regeneración debido a la alta tasa de desaparición de los ejemplares juveniles por la acción de herbívoros introducidos, fundamentalmente el conejo (*Oryctolagus cuniculus*) (Kyncl *et al.*, 2006). Los ejemplares adultos están sufriendo también un progresivo deterioro por causas aún desconocidas.

Teniendo en cuenta que la FBN es, muy probablemente, la principal entrada de nitrógeno a este ecosistema (Wheeler y Dickson, 1990), la reducción de retamas podría poner en riesgo la entrada de este nutriente fundamental.

El panorama expuesto indica lo oportuno del trabajo propuesto en este TFG.

## 2. OBJETIVOS

En este trabajo se persiguen los siguientes objetivos generales:

1. Aislar los rizobios que nodulan *Spartocytisus supranubius* en los suelos de Las Cañadas del Teide. Elaboración de un cepario.
2. Estimar el tamaño de las poblaciones de rizobios y el contenido en nitrógeno total en los distintos tipos de suelo objeto de estudio.
3. Caracterizar genéticamente mediante perfiles M13-RAPD la diversidad genética de las cepas aisladas.
4. Identificar los rizobios aislados mediante análisis filogenético del ADN ribosómico 16S.
5. Evaluar la capacidad para fijar nitrógeno y la presencia de actividad ACC desaminasa en los rizobios aislados.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 SUELOS

Los suelos empleados en el trabajo se recogieron en el Parque Nacional del Teide. Más concretamente en las parcelas de exclusión (vallado) de conejos (7 años de exclusión) y de sus alrededores, situada en las cercanías de los Volcanes de Fasnía (351768E/3130016N) el 22 de diciembre de 2016.

Se consideraron cuatro tipos de suelo en función de si había o no presencia de plantas de retama y/o presencia de letrinas de conejo. Se consideró que el suelo control era aquel con ausencia de leguminosas y de letrinas. En los suelos con retamas las muestras de tierra se tomaron del entorno rizosférico. Asimismo, en estos suelos se tomaron tres muestras al detectarse individuos de edades muy distintas y distinto verdor, teniendo por tanto: suelo de retama vieja, joven y clorótica. En un principio se analizaron por separado, por si se apreciaban diferencias en los contenidos de nitrógeno del suelo en el entorno de la planta. No obstante, como de una de las muestras (retama clorótica) sólo había una réplica, al final se optó por descartarla para los análisis y juntar los otros dos suelos de retama (joven y vieja) en la misma categoría: retama sin letrina (Tabla 1).

En todos los casos se recolectaron, en bolsas estériles, cerca de 500 gramos de suelo que se guardaron en nevera hasta su uso al día siguiente.

EXCLUSIÓN	NO EXCLUSIÓN
Suelo Control (-Retama-LT): - Sin retama - Sin letrina - 3 réplicas	Suelo Letrina sin retama (Letrina-RT): - 3 réplicas
Suelo Retama sin letrina (Retama-LT): - 3 réplicas retama vieja - 2 réplicas retama joven	Suelo Letrina con retama (Letrina+RT): - 3 réplicas

Tabla 1. Características diferenciales de los suelos recogidos en el Parque Nacional del Teide

#### 3.2 MEDIOS DE CULTIVO

A lo largo del trabajo se emplearon diversos medios de cultivo según el organismo (planta o bacteria) y el objetivo. Todos ellos fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 20 minutos.



### ***Agar-Agua***

Un agar al 1% en agua, denominado medio de Agar-Agua (10g agar en 1000ml de agua destilada), se empleó para la germinación de las semillas.

### ***Medio YM***

Por tratarse del medio estándar para el cultivo de rizobios, el principal medio de cultivo bacteriano empleado a lo largo de este trabajo fue el YMA (del inglés Yeast Manitol Agar) cuya composición es:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5g;  $\text{MgSO}_5$ , 0,2mg;  $\text{NaCl}$ , 0,1mg; extracto de levadura 1g; manitol, 8g; agar, 15g/L y agua destilada hasta 1 litro,  $\text{pH}=6,8$ . Para los cultivos de rizobios para los experimentos de reinfección de la retama, se usó este mismo medio pero sin agar (medio YM), al igual que para el crecimiento de los rizobios destinados a la preparación de un cepario de todas las cepas aisladas en los suelos. Alícuotas de estos cultivos, crecidos hasta fase exponencial, se mezclaron con glicerol para alcanzar una concentración final de glicerol al 20%.

Para la extracción de ADN genómico se usó este mismo medio YM sin agar pero reduciendo el contenido en manitol al 0,1% con el fin de evitar la producción de un exceso de polisacárido, que puede complicar el proceso de extracción de ADN genómico.

### ***Medio Bergensen***

El Medio Bergensen se empleó para el ensayo de la actividad ACC desaminasa. Este medio contiene:  $\text{PO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,36g;  $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,10g;  $\text{Cl}_3\text{Fe}$ , 0,02g;  $\text{Cl}_2\text{Ca}$ , 0,04g;  $\text{NO}_3\text{K}$ , 0,29g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{NH}_4$ , 0,38g; Manitol, 10g y agua destilada hasta 1 litro ( $\text{pH}= 7$ ).

## **3.3 VALORACIÓN DEL CONTENIDO EN NITRÓGENO DE LOS SUELOS**

El contenido de nitrógeno en los suelos extraídos de Las Cañadas se valoró a partir de muestras de suelo de 1 gramo. Cada suelo se analizó por duplicado. El contenido en nitrógeno se evaluó mediante el método de Kjeldahl (Cottenie, 1980) en el laboratorio de la Dra. Mercedes Hernández (IPNA, CSIC).

## **3.4 MATERIAL VEGETAL**

Para llevar a cabo el trabajo se usaron semillas de la retama del Teide (*Spartocytisus supranubius*), recogidas en el entorno del Parque Nacional en julio de 2016.

### 3.4.1 TRATAMIENTO DE SEMILLAS: ESCARIFICACIÓN, ESTERILIZACIÓN Y GERMINACIÓN

Debido a que todos los experimentos requerían retamas crecidas, fue necesario germinar las semillas. Se probaron diferentes tratamientos de escarificación a fin de comprobar con cuál se obtenía una mayor tasa de germinación (Guma I.R *et al.*,2009).

Los tratamientos ensayados fueron:

1. Sin tratamiento.
2. Escarificación mecánica con papel de lija.
3. Hervido: introduciendo las semillas 3 minutos en agua recién hervida.
4. Hervido y escarificación química. Al igual que en el caso anterior, se dejaron las semillas en agua caliente 3 minutos. Tras eliminar el agua se sumergieron en un matraz con ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) durante diferentes periodos de tiempo: 15, 30 y 60 minutos. Tras eliminar el ácido sulfúrico se lavaron abundantemente con agua del grifo para eliminar cualquier traza de ácido.

A continuación se pasaron las semillas a una placa y se esterilizaron haciendo un paso previo por alcohol 96° durante 30 segundos, seguido de un tratamiento con lejía comercial (40g/L) diluida al 50% durante 10 minutos. Pasado este tiempo se eliminó la lejía y se hicieron 6 lavados con agua destilada estéril. Una vez esterilizadas, se colocaron sobre placas Agar-Agua y se dejó que germinaran en oscuridad.

### 3.4.2 SOLUCIÓN NUTRITIVA Y PAUTA DE RIEGO PARA EL CULTIVO DE LAS PLANTAS

Las retamas fueron crecidas, en todos los casos, en una habitación acondicionada con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad, a temperatura ambiente. Durante el tiempo de experimentación se regaron cada 2-3 días alternando, una vez cada dos semanas, entre agua destilada y solución nutritiva Riggaud & Puppo (Composición:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,15g;  $KH_2PO_4$ , 0,15g;  $KCl$  0,15g; elementos traza (por litro:  $H_3BO_3$ , 2,85g;  $M_4SO_4 \cdot 4H_2O$ , 2,03g;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0,22;  $CaSO_4 \cdot 5H_2O$ , 0,08g;  $Na_2MoO_4$ , 0,14g, secuestreno, 0,025g, agua hasta 1000ml; pH final de 6,8) para promover el crecimiento del vegetal.

Los sustratos empleados para el cultivo de las plantas, así como las semanas de crecimiento, variaron según el objetivo (aislamiento de rizobios, ensayos de reinfección) y se detallan en el apartado correspondiente.

### 3.5 AISLAMIENTO DE RIZOBIOS Y CÁLCULO DEL NMP

Todos los rizobios empleados en este trabajo se obtuvieron a partir de nódulos radicales de plantas trampa crecidas en los suelos recogidos. No fue posible el aislamiento directo a partir de nódulos de plantas crecidas *in situ* al tratarse de una leguminosa que actualmente tiene un grado importante de amenaza y que crece dentro de un Parque Nacional.

#### 3.5.1 ESTIMACIÓN DE LAS POBLACIONES DE RIZOBIOS EN LOS SUELOS: CÁLCULO DEL NÚMERO MÁS PROBABLE

Se usó la técnica del cálculo del número más probable (NMP) para determinar el número de rizobios viables presentes en los suelos usando la técnica descrita en Somasegaran, P., Hoben, H.J, 1994. Consiste en inocular plántulas de una leguminosa con diluciones de un suelo y estimar la población de rizobios a partir del número de nódulos formados.

**Preparación de diluciones de los suelos.** Para cada suelo se siguió el mismo protocolo: se cribaron las tres muestras (réplicas a, b y c) recolectadas por tipo de suelo, se mezclaron 10g de cada réplica y, a su vez, se suspendieron 10g de esa mezcla en matraces con 90ml de solución salina (8,50g NaCl/1L). De cada suelo se prepararon las diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ .

**Inoculación de semillas.** Las semillas germinadas se plantaron en bandejas (1 por suelo) con semilleros cúbicos de 5x5x5cm distribuidos en 6 filas x 4 columnas. Los semilleros se rellenaron con vermiculita de grado 5 humedecida con solución de Rigaud & Puppo sin nitrógeno. Las suspensiones de suelo sirvieron como suspensión de rizobios para inocular las plántulas de retama. Con cada dilución del suelo se inoculó 1ml a las 4 réplicas de las plántulas.

Las plantas se incubaron en la cámara de crecimiento durante diez semanas hasta que formaran nódulos radicales. Se contó entonces el número de nódulos por planta en cada dilución y se estimó el NMP de rizobios utilizando la tabla de referencia para calcular el número de rizobios, descrita en Somasegaran & Hoben (1994).<sup>1</sup>

Estas plantas crecidas en vermiculita y sembradas con las diluciones de suelos para el cálculo del NMP sirvieron además como plantas trampa para aislar rizobios. Para ello, los nódulos con el mejor aspecto se seleccionaron para el posterior aislamiento de los rizobios.

---

<sup>1</sup> Apéndice 14, pág. 444. Tabla 10.A Number (M) of rhizobia estimated by plant infection count. Tenfold-dilutions.

### 3.5.2 AISLAMIENTO DE RIZOBIOS MEDIANTE SISTEMAS DE PLANTAS TRAMPA

#### *PLANTAS TRAMPAS EN SEMILLEROS CON MEZCLA DE SUELO Y VERMICULITA*

Como se describió en el apartado anterior, las plantas crecidas en semilleros con vermiculita y diluciones de suelo sirvieron de trampa para aislar rizobios.

Por otro lado, se prepararon también plantas trampas mezclando partes iguales de los suelos con vermiculita, en relación 1:2. Se rellenaron con esta mezcla los semilleros y se plantó una semilla en cada uno.

#### *PLANTAS TRAMPA EN JARRAS LEONARD*

Se probó simultáneamente al experimento anterior el aislamiento de rizobios a partir de plantas trampa crecidas en sistemas tipo Jarra Leonard: un recipiente inferior que contiene la solución nutritiva líquida (Riggaud & Puppo), un contenedor central con la mezcla de tierra y vermiculita donde crece la planta, y una parte superior que da espacio para el crecimiento de la parte aérea y sirve de tapa. Se utiliza papel de filtro a modo de mecha para conectar la solución nutritiva y el sustrato.

Al igual que en los casos anteriores, los nódulos obtenidos fueron empleados en la obtención de bacterias.

### 3.5.3 RECUPERACIÓN DE RIZOBIOS A PARTIR DE NÓDULOS RADICALES Y ELABORACIÓN DE UN CEPARIO

#### *RECUPERACIÓN DE RIZOBIOS*

Independientemente del origen del nódulo, en todos los casos se llevó a cabo el mismo procedimiento, explicado a continuación.

#### *A) Esterilización de los nódulos radicales*

1. Se hace un pase rápido por alcohol 96°.
2. Se sumergen en lejía comercial (4% hipoclorito) diluida al 50% durante 10 minutos.
3. Se les dan 6 lavados con agua destilada estéril.

#### *B) Aislamiento*

Para aislar los rizobios contenidos en los nódulos se siguieron los siguientes pasos:

1. Los nódulos esterilizados se trituraron de manera individual en tubos Eppendorf con 50µl de agua destilada estéril.

2. De cada triturado se sembró una alícuota sobre la superficie de una placa de Petri con medio YMA.
3. Las placas se incubaron a 28°C hasta que se desarrollaron colonias.
4. Para comprobar la efectividad de la esterilización, se sembró una alícuota del agua del último lavado, a fin de constatar que no hubiera contaminación de la superficie exterior del nódulo.

### *C) Purificación de las cepas de rizobios*

La purificación de las cepas se realizó haciendo tres resiembras consecutivas de una colonia en placas de YMA. A cada cepa purificada se le asignó una nomenclatura con las letras SSUT (*Spartocytisus supranubius* del Teide) seguido por un número distintivo de cepa. En total se aislaron 40 cepas para su posterior caracterización (ver Anexo 1).

#### *ELABORACIÓN DEL CEPARIO*

Una vez purificadas las 40 cepas, se procedió a la elaboración y conservación del cepario. Para ello se sembraron las diferentes cepas en medio líquido y se crecieron en agitación, hasta fase exponencial temprana. Entonces se añadieron 800 µl en un tubo Éppendorf con 200µl de glicerol estéril, se agitó y se conservaron a -80°C.

### **3.6 EXPERIMENTOS DE REINFECCIÓN DE LOS RIZOBIOS AISLADOS**

A fin de comprobar la capacidad de las cepas aisladas para reinfestar la retama y producir nodulación, se infectaron semillas de retama estériles germinadas como se describe a continuación.

Las semillas fueron escarificadas utilizando el mejor método según el experimento descrito en el apartado 4.1 de Material y Métodos. Como inóculo se utilizó una suspensión bacteriana en solución salina (con una turbidez 5 de McFarland) preparada a partir de rizobios crecidos en placas frescas de YMA (a los 7-12 días, dependiendo de la cepa). Las plántulas (semillas con una radícula de aproximadamente 1-2cm) se infectaron sumergiéndolas en la suspensión bacteriana durante una hora. Para cada cepa de rizobio se infectaron 4 plántulas y se sembraron en Jarras Leonard, colocadas en la cámara de crecimiento durante al menos 6 semanas. Transcurrido ese tiempo se arrancaron para observar la presencia de nódulos.

### **3.7 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ACC DESAMINASA**

Los rizobios que presentan actividad ACC desaminasa son capaces crecer a expensas del ACC como única fuente de nitrógeno. Para estudiar esta capacidad se sembraron alícuotas

de 5µl (cada cepa por duplicado) de una solución salina estéril con turbidez 0,5 de McFarland en placas de: 1) medio Bergensen sin nitrógeno y suplementado con ACC 1,5mM así como 2) un control negativo de medio Bergensen sin nitrógeno y sin ACC.

### 3.8 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Para la extracción del ADN genómico (ADNg) bacteriano, los rizobios fueron crecidos en tubos con medio YM líquido de manitol y se usó el kit comercial GeneALL Isolation Kit (GeneAll Biotechnology Co.Ltd.), siguiendo el protocolo recomendado para la extracción de ADNg de bacterias Gram negativas. Una vez extraído, se conservó hasta su posterior análisis a 4°C.

#### 3.8.1 ELECTROFORESIS Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN GENÓMICO

Una vez extraído el ADNg se realizó una electroforesis para comprobar su estado (su alto peso molecular y que no se hubiera fraccionado en exceso durante el aislamiento) y hacer una cuantificación visual. Para ello se usaron geles de agarosa al 1% en TAE 1x teñidos con Midori Green (1µl). Como marcador de peso molecular se usó el ADN de LambdaHindIII (1µl).

La electroforesis se dejó correr a 60V durante unas 2 horas y las imágenes de los geles se digitalizaron en formato TIFF utilizando el equipo de captura de imágenes de geles (Image Master Video Documentation System, Amersham-Pharmacia Biotech).

Los ADNg se cuantificaron de una manera más precisa usando un NanoDrop Thermo Scientific. Posteriormente se normalizaron las muestras, de manera que cada una contuviera unos 10ng/µl de ADNg.

#### 3.8.2 AMPLIFICACIÓN POR PCR Y M13 RAPD FINGERPRINT

Con el objetivo de conocer la diversidad genética a nivel de cepa, detectar cepas redundantes y obtener una huella molecular que sirviera para reconocer cada aislado en estudios posteriores, todos los rizobios aislados fueron en primer lugar caracterizados utilizando una técnica de *fingerprint*. Para este estudio se eligió la técnica RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) que permite discriminar entre cepas (Velázquez *et al.*, 2010; Armas-Capote *et al.*, 2014).

La mezcla de reacción, para un volumen final de 25µl fue: Premix Taq<sup>TM</sup> (TaKaRa Taq<sup>TM</sup> 1,25 units/25µl; dNTP Mixture 2x conc., ea.0,4mM; PCR Buffer, 20mM Tris-HCl, pH 8.3, 100mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>), 12,5µl; cebador M13 (5'GAGGGTGGCGGTTCT-3'), 2µl;

DMSO, 1 $\mu$ ; agua estéril 6,5 $\mu$ l y 3 $\mu$ l del ADNg muestra. En la amplificación se emplearon los siguientes parámetros de ciclado (Tabla 2):

	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	9 min
35 ciclos de:		
Desnaturalización	95°C	1 min
Anillamiento	45°C	1 min
Extensión	75°C	2 min
Extensión final	72°C	7 min

Tabla 2. Parámetros de ciclación M13 RAPD

Los productos de la amplificación fueron resueltos en una electroforesis en gel de agarosa al 1% con buffer TAE 0,5 y teñido con Midori Green (1 $\mu$ l). En los pocillos se añadieron 12 $\mu$ l de los amplicones con 2 $\mu$ l de Buffer 10x y se utilizó un marcador de 500pb (3 $\mu$ l) como marcador de peso molecular.

Las imágenes (archivos TIFF) se obtuvieron con el equipo de captura de imágenes de geles y las bandas se procesaron con el programa GelComparII (Versión 2.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). En este software se marcan y definen los tamaños de las bandas del marcador de peso molecular. Para nuestro perfil se usó el marcador “escalera de 500pb”, que contiene fragmentos de ADN de 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 y 4000pb. Este marcador se carga en tres posiciones del gel (extremos y centro) y sirve para normalizar el gel frente a posibles distorsiones durante la electroforesis, además de servir como sistema de referencia para poder comparar la posición entre las diferentes bandas de electroforesis.

El dendrograma se construyó usando el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Averages) con el coeficiente de Pearson, considerado el más adecuado para la identificación de huellas moleculares de ADN (Häne *et al.*, 1993), ya que tiene en cuenta, además de la presencia o ausencia de bandas, la cantidad o importancia de las mismas.

### 3.8.3 AMPLIFICACIÓN POR PCR Y SECUENCIACIÓN DEL GEN DEL ADN 16S

Los perfiles RAPD fueron utilizados para seleccionar cepas de grupos genómicos diferentes para secuenciación del gen ADN ribosómico 16S.

La mezcla para la reacción para la amplificación de la secuencia completa de este gen fue: Premix Taq<sup>TM</sup>, 12 $\mu$ l; fD1, 1 $\mu$ l; rD1, 1 $\mu$ l; agua miliQ estéril, 8,5 $\mu$ l y ADNg, 2 $\mu$ l. Se

empleó la pareja de cebadores universales fD1 (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCTCAG-3') y rD1 (5'- AAGGAGGTGATCCAGCC-3'). (Weisburg *et al.*, 1991).

La amplificación se realizó en un termociclador Perkin Elmer 9600, con los siguientes parámetros de ciclado (Tabla 3).

	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, 10s
Extensión final	72°C	6min, 20s

Tabla 3. Parámetros de amplificación de secuenciación 16S

Posteriormente se comprobó la amplificación de los fragmentos mediante una electroforesis con los siguientes componentes:

- Para las muestras: 3µl ADNg, 1µl Buffer, 6µl agua destilada estéril.
- Marcador molecular: 2µl marcador 100pb, 1µl Tampón 10x, 7µl agua destilada estéril.

Tras comprobar que los fragmentos habían sido amplificados en cantidad suficiente se prepararon alícuotas y se enviaron a secuenciar a MACROGEN Europe, Ámsterdam. Todas las secuencias se analizaron usando el software MEGA 7 (Kumar, Stecher and Tamura, 2016). Para el alineamiento de las secuencias se utilizó la herramienta Clustal W incluida en el MEGA, y para la construcción de los árboles filogenéticos se empleó el método de Neighbour-Joining con el parámetro de distancias Kimura-2 (NJ-K2p). El cálculo del soporte de cada nodo de las ramas se realizó con el método de bootstrap (BS) con 1000 réplicas. Se incluyeron como referencia cepas tipo de varias especies tomadas del NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>).



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ENSAYOS DE GERMINACIÓN

Las semillas de retama, al igual que la de muchas otras leguminosas, requiere de un proceso de escarificación ya que posee una semilla dura que dificulta su germinación. En este trabajo se ensayaron diferentes tratamientos, tal y como se muestra en la Tabla 4. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 1 y Tabla 5.

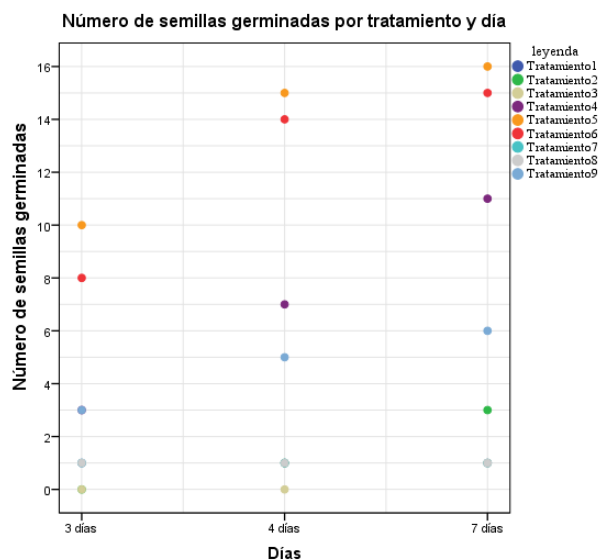


Figura 1. Número de semillas germinadas por tratamiento y día.

Tratamiento	
1	Sin tratamiento
2	Escarificado mecánico
3	Sólo 3min. Calor
4	3min calor + 15min H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
5	3min calor + 30min H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
6	3min calor + 60min H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
7	15min H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
8	30min H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
9	60min H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

Tabla 4. Tratamientos ensayados.

		Tratamiento								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
<b>Día 3</b>	Semillas germinadas	1	0	0	3	10	8	1	1	3
<b>Día 4</b>	Semillas germinadas	1	1	0	7	15	14	1	1	5
<b>Día 7</b>	Semillas germinadas	1	3	1	11	16	15	1	1	6
<b>Total semillas</b>		20	20	19	18	17	15	19	18	21
<b>Porcentaje germinación</b>		5%	15%	5,26%	61,11%	94,12%	100%	5,26%	5,56%	28,57%

Tabla 5. Tratamientos de escarificación y los números y porcentajes de semillas germinadas.

Como se puede apreciar, los tratamientos con los que se consiguió una mayor tasa de germinación fueron el 5 (3 minutos de calor + 30 minutos de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) y el 6 (3 minutos de calor + 60 minutos de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) con los cuales se obtuvo un porcentaje de germinación de 94,12% y 100%, respectivamente. Es decir, los dos tratamientos que combinaron un tratamiento térmico con escarificación química.

Por otro lado, queda claro que los tratamientos en los que únicamente se aplicó sulfúrico durante 15 minutos (tratamiento 7) y 30 minutos (tratamiento 8) coinciden en

mostrar que ninguno resulta eficaz sin una activación térmica previa de las semillas. Este hecho resulta quizás aún más llamativo cuando se comparan los tratamientos 6 y 9, ambos con 60 minutos de sulfúrico que, sin embargo, muestran resultados de germinación tan dispares (100% en el 6 y 28,97% en el 9). La única diferencia son los 3 minutos de calor en el primer caso, lo cual nuevamente pone de manifiesto la necesidad de activación por calor.

Es interesante mencionar que en un estudio realizado con otras leguminosas forrajeras endémicas de Canarias (Pérez de Paz, *et al.*, 1986) donde se estudiaron varias especies de esta familia y se probaron diferentes tratamientos de germinación, se encontró que en todas las especies el tratamiento con mayor tasa de germinación fue el hervido de las semillas, alcanzándose un porcentaje máximo de 89% de germinación. Es de destacar que la tasa de germinación conseguida en nuestro trabajo con retama alcanzó el 100%.

A partir de nuestros datos decidimos seleccionar para todos los ensayos posteriores de germinación el tratamiento 5 (3 minutos de calor seguido de 30 minutos de sulfúrico) ya que, si bien presenta un porcentaje de germinación ligeramente inferior al tratamiento 6, sigue teniendo una muy alta tasa de germinación e implica un ahorro importante de tiempo (30 minutos) respecto al 6 (1 hora).

## 4.2 CONTENIDO DE NITRÓGENO

Un aspecto interesante a estudiar era el contenido en nitrógeno total de los suelos recogidos en Las Cañadas ya que se trata de suelos con bajo contenido en este elemento (Arbelo *et al.*, 2009), lo cual resaltaría la importancia de la fijación biológica del nitrógeno asociada a la retama como un factor determinante en estos suelos. Estudios previos habían demostrado ya un mayor contenido de este elemento en los alrededores de las retamas (Wheeler y Dickson, 1990). Para este estudio se consideró, además de los suelos sin leguminosas y los suelos alrededor de las retamas (donde la FBN adquiere protagonismo), muestras de suelo donde el aporte de nitrógeno es fundamentalmente biológico, como son los suelos con presencia de letrinas de conejo. Los resultados se presentan en la Figura 2.

El suelo control (sin retama en zona de exclusión) es el que presentó un menor contenido de nitrógeno (0,069%). Esto es un resultado coherente con lo esperado, pues al no estar bajo la influencia de las retamas noduladas por rizobios y en zona sin letrina, no hay aporte de nitrógeno ni por FBN ni de origen orgánico por conejos.

El suelo con letrina sin retama (Letrina-RT) presentó un contenido en nitrógeno del 0,132% y, por lo tanto, un contenido en este elemento mayor que en suelo control, lo que se explica al contar con un aporte de nitrógeno orgánico debido a la presencia de letrinas de conejo. Aun así, el contenido en nitrógeno en este suelo es casi la mitad que en el suelo obtenido de la rizosfera de la retama en zona de exclusión (Retama-LT, 0,23%), donde el aporte de este elemento se debe exclusivamente a la FBN. De hecho, éste es el suelo con el mayor contenido en nitrógeno. Es interesante destacar también el hecho de que el suelo con retama y letrina (Letrina+RT) presentó un valor intermedio (0,168%) entre los valores obtenidos de cada uno de estos suelos por separado. Estos resultados podrían ser explicados por un cierto grado de inhibición de la FBN en presencia de nitrógeno orgánico.

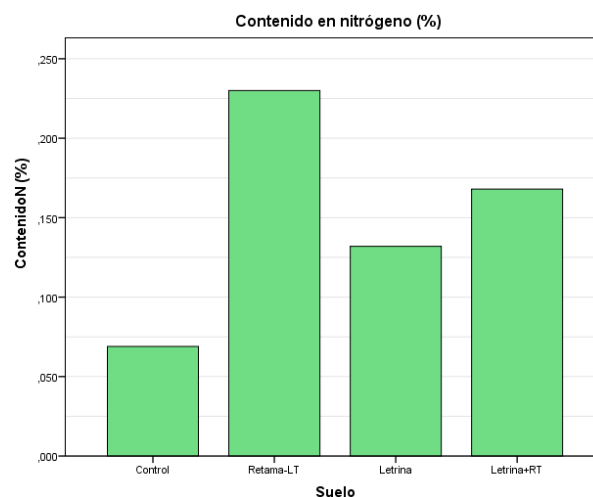


Figura 2. Contenido en nitrógeno en los diferentes suelos

Por lo tanto, nuestros resultados ponen en evidencia la importancia de la FBN como principal entrada de nitrógeno en el ecosistema de Las Cañadas. Además, estudios previos indican que los suelos situados fuera de la zona de exclusión (alejados de letrina y retamas) son los más pobres, incluso con menor contenido en nitrógeno que los suelos control situados en los vallados de exclusión. Esto exagera la importancia de la presencia de las retamas en un ecosistema en el que el suelo está sufriendo una reducción en el contenido de nitrógeno, probablemente debido a la reducción de la población de retama (Cubas *et al.*, 2017).

### 4.3 NÚMERO MÁS PROBABLE

Dadas las diferencias obtenidas en el contenido en nitrógeno en los suelos de estudio, el siguiente objetivo perseguido fue comprobar si existían diferencias importantes en el número de rizobios en los suelos bajo la acción de las leguminosas con respecto a los suelos con letrina y suelo control.

Las poblaciones de rizobios se estimaron a partir de ensayos de infectividad usando la técnica de NMP (Número Más Probable). Las plantas se inocularon con diferentes diluciones de suelo y 10 semanas después se contó el número de nódulos formados. Los resultados se muestran en la Figura 3.

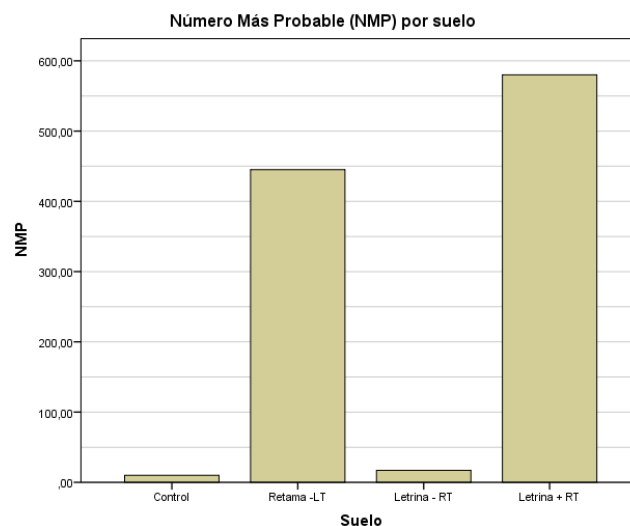


Figura 3. NMP de rizobios por cada tipo de suelo.

Como cabía esperar, el suelo control presentaba el número más bajo de rizobios (10), similar al suelo con letrina y sin retama (17). Curiosamente, se encontró que los suelos de la rizosfera de retama sin letrina presentaban valores inferiores de rizobios (445) a los suelos con retama y letrina (580). Aunque habría que comprobar si este resultado es realmente significativo, esta diferencia podría deberse al estado de las retamas en el momento de su recolección. En el suelo con retama sin letrina, el sustrato (vermiculita) se compactó, lo que podría haber dificultado el correcto desarrollo de sus raíces. En el suelo con letrina, sin embargo, la vermiculita no llegó a compactarse.

Aun así, si se repitiese el ensayo y se obtuviesen resultado similares, el hecho de que el suelo con mayor número de nódulos (Letrina+RT) no se corresponda con el que tiene el mayor contenido en nitrógeno (Retama-LT) estaría de acuerdo con la idea de que hubiera cierta inhibición de la FBN en presencia de letrina de conejo.

#### 4.4 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ACC DESAMINASA

Las extremas condiciones climáticas en Las Cañadas pueden suponer estrés para las plantas. Como se comentó anteriormente, la actividad ACCd disminuye los niveles de etileno, hormona vegetal que se libera en condiciones de estrés y que puede tener efectos negativos a

elevadas concentraciones. Es por tanto de interés la presencia de actividad ACCd en los rizobios que nodulan a la retama, y por ello se abordó en este estudio.

Como se describió en el apartado de Material y Métodos, para detectar la presencia de actividad ACCd, las bacterias se crecieron en la superficie de medio mínimo de Bergensen utilizando ACC como única fuente de nitrógeno, comparando el crecimiento con placas “control negativo” en el mismo medio pero sin fuente de nitrógeno alguna. Dos semanas después de la siembra se observó crecimiento en las placas suplementadas con ACC en las cepas SSUT1, SSUT6, SSUT9, SSUT21 y SSU27. Curiosamente, se encontraron únicamente cepas con actividad ACCd en suelos donde había retama: retama sin letrina (cepas SSUT1, SSUT6 y SSUT9, ver Figura 4) y retama con letrina (cepas SSUT21 y SSUT27), pero no en suelo con letrina sin retama. Tras realizar la secuenciación del gen ribosómico 16S, la cepa SSU1 resultó ser *Bradyrhizobium canariense*, mientras que las cepas SSUT6, SSUT21 y SSUT27 eran *Agrobacterium rhizogenes*.

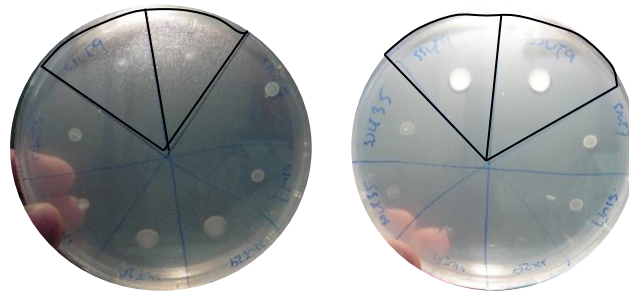


Figura 4. Crecimiento de la cepa SSUT9 en ausencia (izquierda) y en presencia de ACC (derecha).

#### 4.5 ENSAYOS DE REINFECCIÓN DE LOS RIZOBIOS AISLADOS

A fin de comprobar la infectividad de las cepas aisladas se realizó un ensayo de reinfección. Tras dejar durante 6 semanas a las retamas en la cámara de crecimiento se estudió la formación de nódulos en las raíces de retama.

Ninguna de las retamas estudiadas presentó nodulación, ni siquiera el control positivo, inoculado con *B. canariense*. Esto probablemente se deba a que, al tratarse de una leguminosa arbustiva, el tiempo de crecimiento y de desarrollo radical de la retama es lento. De hecho, las raíces estaban poco desarrolladas, presentando escasas (o ninguna) raíces laterales.

Teniendo en cuenta que al principio del estudio (para el cálculo del NMP) sí se obtuvieron nódulos, es posible que la falta de nodulación se debiera a una falta de tiempo.

## 4.6 PERFILES M13 RAPD

El análisis de perfiles RAPD permite discriminar entre cepas de una misma especie, siendo un método adecuado para el estudio de la diversidad genética de las especies de rizobios (Rajasundari, K., *et al.* 2009, Velázquez, E., *et al.* 2010, Armas-Capote *et al.*, 2014). Este análisis se empleó para realizar una primera valoración sobre la diversidad genética de las cepas aisladas y la detección de cepas redundantes. Se pudieron obtener perfiles RAPD (Figura 5) de 32 de las 40 cepas inicialmente aisladas de los nódulos de *S. supranubius*. Estos perfiles consistieron en un bandeo de tamaños comprendido entre 500-3000pb.

Se consideraron idénticas cepas con similitud igual o superior al 97%, de tal manera que, de las 32 cepas analizadas, 8 eran redundantes, obteniéndose un total de 24 perfiles diferentes. En general, no se encontró correlación entre los agrupamientos de cepas y los tipos de suelos. Sin embargo, destaca un clúster grande y con alta similitud (> 93%) que incluyó solamente cepas aisladas en suelo con retama (cepas SSUT4, SSUT15, SSUT31, SSUT34).

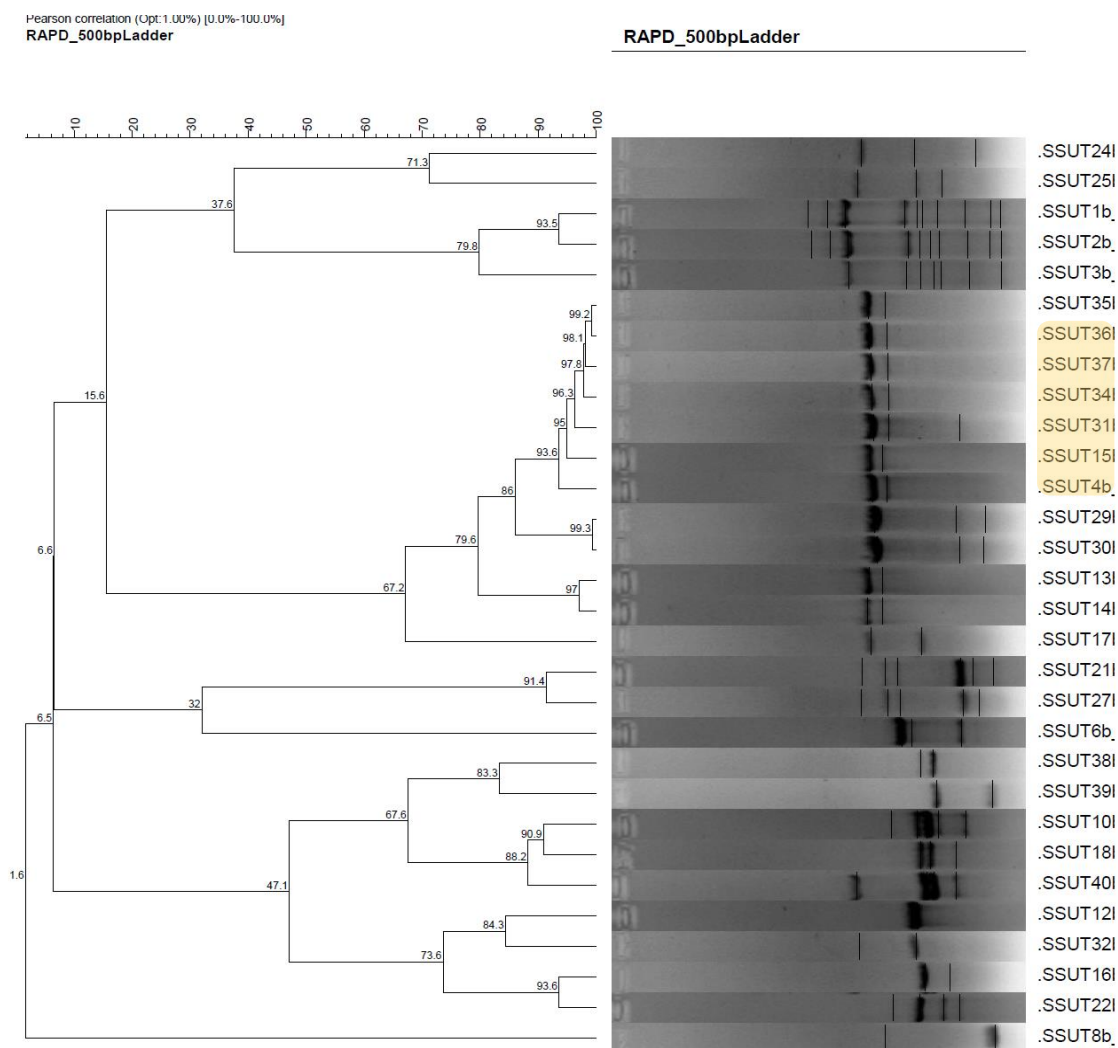


Figura 5. Dendrograma Pearson/UPGMA de los perfiles RAPD, correspondientes a los aislados de nódulos de retama del Teide

## 4.7 SECUENCIACIÓN DEL GEN DEL ARNr 16S

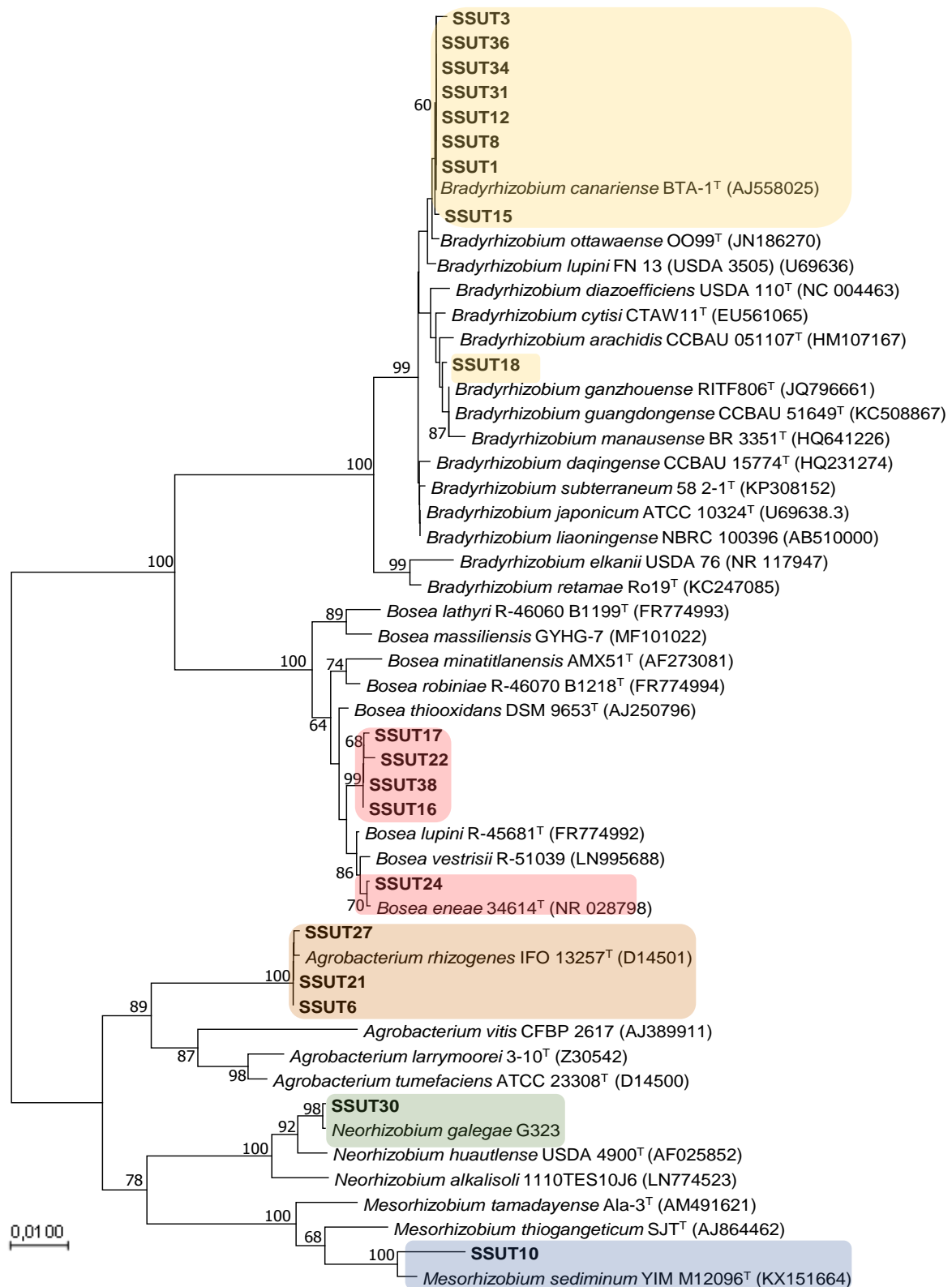


Figura 6. Árbol filogenético (NJ-k2p) basado en una secuencia parcial (1278nt) del gen ribosómico 16S de las cepas SSUT, aisladas de nódulos de *Spartocytisus supranubius* y cepas de referencia de las especies más próximas obtenidas del GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Los números de los nodos muestran el porcentaje de apoyo (sólo se muestran valores superiores al 60%) de las ramas mediante el método *bootstrap* con 1000 réplicas.

El análisis de la secuencia del gen del ADN ribosómico 16S es la técnica más utilizada para el estudio de la taxonomía y filogenia bacteriana. Esto es debido principalmente a su presencia universal en todas las especies bacterianas y a su alto grado de conservación, permitiéndonos incluso asegurar que cepas con un valor de semejanza inferior al 97% constituyen una nueva especie (Janda, M.J., *et al.*, 2007). El gen que codifica para el ARNr 16S se amplificó usando la pareja de cebadores universales fD1/rD1 y se obtuvo un único fragmento de aproximadamente 1500 pb, que corresponde a la secuencia casi completa del gen. Las secuencias obtenidas se alinearon y compararon mediante BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) con las cepas tipo de las especies más próximas obtenidas del GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

El árbol filogenético (Figura 6) muestra que las 24 cepas seleccionadas aisladas de los nódulos de la retama se correspondían a varios géneros: *Bradyrhizobium* (10 aislados) *Mesorhizobium* (1 aislado) *Neorhizobium* (1 aislado), *Bosea* (5 aislados) y *Agrobacterium* (3 aislados). También se aisló una cepa (SSUT32) del género *Nocardioides* que no se incluye en el árbol.

Como puede observarse en la Figura 6, el grupo mayoritario de microsimbiontes de la retama del Teide pertenecen al género *Bradyrhizobium*. Además, con una excepción (SSUT18), todas las cepas SSUT posiblemente pertenecen a la especie *B. canariense*, ya que mostraron una similitud (calculada a partir de la p-distancia) entre 99,7 y 100% con la especie *B. canariense*. Las cepas SSUT14 y SSUT40, tras comprobar mediante comparación de fragmentos parciales de su secuencia, su afiliación al género *Bradyrhizobium* y su proximidad a *B. canariense*, fueron excluidas del árbol filogenético por poseer numerosos errores de secuenciación. Es interesante que la mayoría de las cepas de esta especie se corresponden con el grupo RAPD de escasa diversidad (<93%) mencionado anteriormente. Los perfiles RAPD asimismo sirvieron para mostrar que las cepas SSUT2, SSUT35 y SSUT34 eran redundantes (>97% de similitud) y por ello no se secuenciaron. Sin embargo, deben pertenecer también a la especie *B. canariense*.

Es sumamente interesante el hecho que todas las cepas del género *Bradyrhizobium* fueron aisladas de rizosfera de retama en ausencia de letrina. Sólo hubo una cepa aislada de suelo con letrina (SSUT18), pero justamente esta no pertenece a la especie *B. canariense*, sino que está relacionada con otras como *B. cytisis* y *B. arachidis*. Por tanto, se puede concluir que todas las cepas de *B. canariense* se encuentran en ausencia total de letrina. Una posible



explicación podría ser la alcalinización del suelo como consecuencia de la urea presente en las letrinas de conejo, que podría afectar negativamente a *B. canariense*, una bacteria que parece preferir ambientes más ácidos (Vinuesa, *et al.*, 2005).

El otro grupo mayoritario pertenece al género *Bosea*. Al contrario que *Bradyrhizobium*, todas las cepas de *Bosea* fueron aisladas de suelos con letrina (tanto letrina con retama como sólo letrina) siendo el género predominante en estos suelos. Sólo una de las cepas, SSUT24, está muy relacionada con una especie previamente descrita, *B. enea* (similitud 99,8%), pero todas las demás cepas quedaron agrupadas en una misma rama, con un 99% de *bootstrap*, en un clúster claramente separado de todas las demás especies de *Bosea* descritas hasta la actualidad, sugiriendo que se trata de un nuevo linaje y posiblemente una nueva especie. Es necesario mencionar que algunas especies de este género (*B. lathyri*, *B. lupini* y *B. robiniae*) también se han aislado de nódulos de leguminosas (De Meyer, *et al.*, 2012). No obstante, no se han encontrado los genes de nodulación *nodA* y *nodC*, y aunque se detectó el gen *nifH* (implicado en la fijación de nitrógeno atmosférico) resultó ser no específico, por lo que se ha propuesto que se trata de endófitos de nódulos, pero no verdaderos simbiosiontes (De Meyer, *et al.*, 2012), que podrían haber aprovechado la entrada de un rizobio para penetrar en el nódulo. De hecho, esto podría ser justamente el caso en la retama, ya que en otras leguminosas arbustivas, como el tagasaste (*Chamaecytisus proliferus*) se ha descrito un proceso que no implica entrada por tubo de infección, sino que tiene lugar por *crack*, es decir, a través de roturas y avance por los espacios intercelulares, desde la epidermis al córtex (Vega-Hernández, *et al.*, 2001, Skawińska, M, *et al.*, 2017) lo que facilita la entrada de otras bacterias además del propio rizobio. Otra posible explicación es que los aislados de *Bosea* podrían tener los genes de nodulación localizados en plásmidos simbióticos que se perdieron durante el proceso de aislamiento y purificación, como se ha descrito en otros casos (Estrella, *et al.*, 2009). En todo caso, el suelo del que se aislaron fue el que presentó el NMP más elevado (ver Figura 3), por lo que sería sumamente interesante continuar con los ensayos de reinfección para comprobar si efectivamente nodulan a la retama.

Además de *Bosea* y *Bradyrhizobium*, se obtuvieron también otros géneros con menor representación. Por un lado, tres de las cepas (SSUT27, SSUT21 y SSUT6) resultaron pertenecer a *Agrobacterium*, probablemente a la especie *A. rhizogenes*, al poseer secuencias 16S con un 99,8-100% de similitud. De estas cepas, SSUT6 se obtuvo de suelo de retama y las otras dos, de letrina y retama. Es interesante mencionar que las cepas SSUT21 y SSUT27

presentaron actividad ACCd, una característica relativamente común en este género (Saleem, M *et al.*, 2007).

Por otro lado, de suelo de letrina y retama se aisló también una cepa (SSUT30) del género *Neorhizobium*, siendo *N. galegae* la especie más próxima (semejanza del 99,4%), un simbiote de algunas especies del género *Galegae*.

Asimismo, de suelo de retama se aisló una bacteria del género *Mesorhizobium* (cepa SSUT10). Curiosamente, la especie descrita más próxima, con un 98,9% de similitud, es *M. sediminum*, descrita recientemente y aislada de sedimentos marinos (Yuan, C. *et al.*, 2016).

En resumen, de los nódulos de retama del Teide se aislaron un total de 6 géneros diferentes, siendo *Bradyrhizobium* y *Bosea* los géneros dominantes (Figura 7).

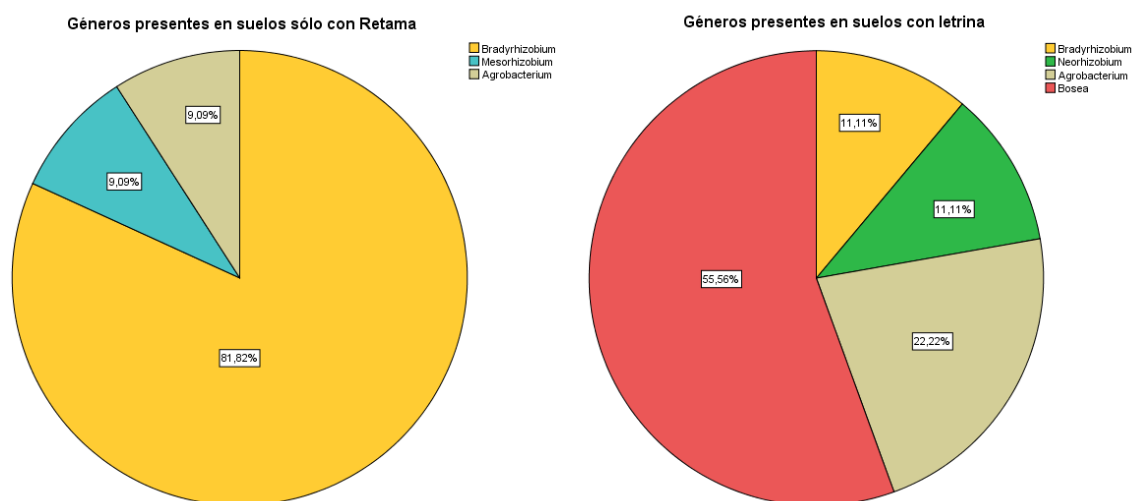


Figura 7. Representación gráfica de los géneros presentes en los diferentes tipos de suelo: sólo retama y con letrina (Letrina-RT, Letrina+RT).

Como se aprecia claramente en la Figura 7, el suelo de retama y los suelos con letrina muestran diferencias en los géneros de bacterias presentes. La única diferencia entre ambos tipos de suelo es la presencia o ausencia de letrina, por lo que se podría decir que la presencia del conejo es un factor importante en la diversidad de bacterias presentes en estos suelos, y que por lo tanto afecta a la simbiosis entre los rizobios y la retama. Mientras que en la rizosfera de la retama en zona de exclusión (sin letrina) el género *Bradyrhizobium* es el mayoritario, éste no se encuentra (con una excepción) en suelos con letrina. Es decir, *B. canariense*, la especie que en principio esperaríamos como simbiote típico de las leguminosas arbustivas canarias (Jarabo-Lorenzo, *et al.*, 2000, Vinuesa, *et al.*, 2005) está completamente ausente en presencia de letrina. Además, en suelos con letrina la diversidad es

mayor y muestra géneros que normalmente no nodulan leguminosas, como *Agrobacterium* y, sobre todo, *Bosea*.

En conclusión, la especie potencialmente fijadora natural de la retama, *B. canariense*, es excluida de los suelos con letrina, y en estos casos está sustituida por otros géneros que no suelen nodular (principalmente, *Bosea*). Si estas especies, efectivamente, no fijaran el nitrógeno o fueran malas fijadoras, se pondría en riesgo la FBN en el Parque Nacional de Las Cañadas del Teide, lo que su vez que supondría un grave problema para el mantenimiento de este frágil ecosistema.

## 5. CONCLUSIONES

1. La germinación de las semillas de *Spartocytisus supranubius* requiere de una escarificación previa. El mejor método, con una germinación del 100%, consistió en un tratamiento térmico durante 3 minutos seguido de una escarificación química con ácido sulfúrico concentrado durante 60 minutos.
2. El mayor contenido en nitrógeno se encontró en el suelo con retama sin influencia de letrina, poniendo de manifiesto la importancia de la FBN en el ecosistema de Las Cañadas.
3. El suelo con letrina y retama fue el que presentó el número más probable (NMP) de rizobios más elevado.
4. Las cepas aisladas se incluyeron en 6 géneros: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Neorhizobium Bosea*, *Agrobacterium* y *Nocardioides*. El género mayoritario aislado fue *Bradyrhizobium*.
5. Las especies mostraron distinta distribución en los suelos. La especie *B. canariense* predominó claramente en ausencia de letrina, mientras que en suelo con letrina fue un nuevo linaje perteneciente al género *Bosea*, el grupo mejor representado.
6. Los perfiles RAPD mostraron gran diversidad genética a nivel de cepa, obteniendo 24 perfiles diferentes entre 32 analizados. Solo 8 cepas fueron redundantes y un grupo de cepas de *B. canariense* mostró escasa diversidad.
7. De las 40 cepas aisladas de nódulos, 5 presentaron actividad ACCd, y pertenecían a *Agrobacterium rhizogenes* y *Bradyrhizobium canariense*.
8. *B. canariense*, probablemente el simbiote natural de la retama, resultó excluida de los suelos con letrina. En estos suelos es sustituida por otras bacterias como *Bosea*, que no suelen nodular. Si se confirmara esta situación se pondría en riesgo la entrada de nitrógeno en el Parque Nacional del Teide, lo que supondría un serio problema para el mantenimiento de este ecosistema.

## CONCLUSIONS

1. The germination of *Spartocytisus seeds* requires a previous scarification. The best method, with a 100% germination rate, consisted in heat treatment for 3 minutes followed by a chemical scarification with sulphuric acid during 60 minutes.
2. The highest content of nitrogen was found in the soil from the legume without latrine, thus demonstrating the importance of the BNF in this ecosystem.
3. The soil with latrines and broom was the soil with the highest MPN count.

4. The isolated strains belonged to 6 different genera: *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Neorhizobium*, *Bosea*, *Agrobacterium* and *Nocardioides*. The main isolated genus was *Bradyrhizobium*.
5. The species showed a different distribution among the different soils. *B. canariense* dominated in absence of latrine, whereas in soils with latrine the best represented genus was a new lineage of *Bosea*.
6. The RAPD profiles showed a large genetic diversity at strain level. From 32 analysed strains, 24 different profiles were obtained. Only 8 were considered redundant and a group of strains from *B. canariense* exhibited low diversity.
7. Out of the 40 isolated strains, 5 showed ACCd activity and belonged to the species *Agrobacterium rhizogenes* and *Bradyrhizobium canariense*.
8. The potential natural symbiont of the broom, *B. canariense*, was excluded from soils with latrine. In these soils, it is substituted by other bacteria like *Bosea*, which do not usually nodulate. Were this situation confirmed, the nitrogen supply in Teide National Park would be at risk, which would mean a serious problem in the maintenance of this fragile ecosystem.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. A.C. Parte. (1997-2017) All names cited in the List of Prokaryotic names with standing in nomenclature. Recuperado de <https://bacterio.net>.
2. Armas Capote, M., Pérez Yépez, J., Martínez Hidalgo, P., Garzón Machado, V., Del Arco Aguilar, M., *et al.* 2014. Core and symbiotic genes reveal nine *Mesorhizobium* genospecies and three symbiotic lineages among rhizobia nodulating *Cicer canariensis* in its natural habitat (La Palma, Canary Islands). *Systematic and Applied Microbiology* 37:140-148.
3. Arbelo, C.D., Sánchez, J., Notario, J., Mora, J.L. 2009. Caracterización en entorno SIG de los suelos del Parque Nacional del Teide. Dinámica de nutrientes y carbono en los suelos pp. 43-71. *En: Proyectos de investigación en Parques Nacionales: 2005-2008.* Organismo Autónomo de Parques Nacionales.
4. Berrada, H., Fikri-Benbrahim, K. 2014. Taxonomy of the Rhizobia: current perspectives. *British Microbiology Research Journal*. 4(6): 616-639.
5. Bramwell, D., Bramwell, Z. 2001. Flores Silvestres de las Islas Canarias. Editorial Rueda S.L.
6. Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (Repetitive Extragenic Palindromic and Enterobacterial Repetitive Intergeneric Consensus) Sequences and the Polymerase Chain Reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 57 (9): 2180-2187
7. De Meyer, S., Wilems, A. 2012. Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupine* sp.nov., *Bosea lathyri* sp. nov and *Bosea robiniae* sp.nov., isolated from legumes. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:2505-2510.
8. Estrella, M.J., Muñoz, S., Soto, M.J., Ruiz, O., Sanjuán, J. 2009. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River basin (Argentina). *Applied and environmental Microbiology*. 75 (4): 1088-1098.
9. Fernández-Barragán, J., Reina Belinchón, J. 2011. Seguimiento del estado fitosanitario de las masas forestales en la red de Parques Nacionales: Informe de resultados 2011. Área de seguimiento de Recursos y Programas Centralizados Organismo Autónomo Parques Nacionales.
10. Galloway, J.N., Aber, J.D., Erisman, J. W., Seitzinger, S.P., Howarth, R. H., Cowling, E., Cosby, J. 2003. The Nitrogen Cascade. *Bioscience* 53(4):341-356.
11. Glick, B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological Research*. 169:30-39
12. Guma, I.R., Mederos Padrón, M.A., Santos Guerra, A., Reyes-Betancort, J.A. 2009. Evaluation of methods to remove hardseededness in *Cicer canariense*, a perennial wild relative of chickpea. *Seed Science and Technology* 38:209-213.
13. Häne, B.G., Jäger K., Drexler, H.G. 1993. The Pearson product-moment correlation coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis*, 14: 967-972.
14. Hungría, M., Menna, P., Delamuta, J.R.M 2015. *Bradyrhizobium*, the ancestor of all rhizobia: phylogeny of housekeeping and nitrogen-fixation genes. Capítulo 18, p.191-202. *En: De Bruin, F. (Ed.) Biological nitrogen fixation.* John Wiley & Sons Inc, New Jersey,
15. Janda, M.J, Abbot, S.L. 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 2761-2764.
16. Jarabo-Lorenzo, A., Velázquez, E., Pérez-Galdona, R., Vega-Hernández, M., Marínez-Molina, E. 2000. Restriction fragment length polymorphism analysis 16S rDNA and Low Molecular Weight RNA profiling of Rhizobial isolates from shrubby legumes endemic to the Canary Islands. *Systematic and applied microbiology*. 23:416-425.
17. Kumar, S., Stecher, G, Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics and Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870-1874.
18. 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: 97-108.
19. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Stahl, D.A., Clark, D.P. 2011. Microbial Symbioses, p. 720-750. *En: Brock, Biology of Microorganisms.* Benjamin Cummings Publishers, San Francisco.

20. Mayak S., Tirosh T., Glick, R. B. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant physiology and biochemistry* 42:565-572.
21. NZ Rhizobia. The current taxonomy of rhizobia. Recuperado de <https://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>
22. Pérez de Paz, P.L., Del Arco Aguilar, M.J., Acebes Ginovés, J.R., Wilpret de la Torre, W. 1986. Leguminosas forrajeras de Canarias. Act/Museo Insular de Ciencias Naturales, Tenerife,
23. Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S., Bhatti, A.S. 2007. Perspective of plant growth promoting bacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiological Technology* 34:635-648.
24. Skawińska, M., Lotocka, B., Ruskowski, T., Banaszczak, P., Znojek, E. 2017. Root nodule structure in *Chamaecytisus podolicus*. *Agro botanica* 70(2):1716.
25. Somasegaran, P., Hoben, H. J. 1985. To count rhizobia by a plant infection method, p.73-84. *En: Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology*. Berlín: Springer Verlag.
26. Vega-Hernández, M.C., Pérez-Galdona. R., Dazzo, F.B., Jarabo-Lorenzo, A., Alfayate, M.C, *et al.* 2001. Novel infection process in the indeterminate root nodule symbiosis between *Chamaecytisus proluferus* (Tagasaste) and *Bradyrhizobium* sp. *New Phytologist* 150:707-721.
27. Velázquez, E., Valverde, A., Rivas R., Gomis, P., Gantois, I., *et al.* 2010. Strains nodulating *Lupinus albus* on different continents belong to several new chromosomal and symbiotic lineage within *Bradyrhizobium*. *Antonie van Leewenhoek* 97:363-376.
28. Versalovic, J., Koeuth, T., Lupski J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19 (24): 6823-6831
29. Vieneses. P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, *et al.* 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., and acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *Genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *International Journey of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:569-575.
30. Voggenreiter V (1975) Vertikalverbreitung der natürlichen und introduzierten Flora in der zentralen SW-Abdachung von Tenerife Monographiae Biologicae Canarienses 6
31. Wheeler, C.T., Dickson, J.H. 1990. Symbiotic nitrogen fixation and distribution of *Spartocytisus supranubius* on Las Cañadas, Tenerife. *Vieraea* 19: 309-314.
32. Yuang, C., Jiang, Z., Xiao, M., Zhou, E., Kim, C., *et al.* 2016. *Mesorhizobium sediminum* sp.nov., isolated from deep-sea sediment. *International journey of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66:4797-4802.
33. Zahran, H.H. 1999. *Rhizobium*-Legume Symbiosis and Nitrogen Fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiology and molecular biology*. 63 (4): 968-989.
34. Weisburg W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J. 1991. 16S ribosómico DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology* 173(2): 697-703.

## ANEXO 1. TABLA DE CEPAS SSUT AISLADAS DE NÓDULOS DE RETAMA

Suelo	Número de cepa	Descripción colonia	Género más afín	Actividad ACC desaminasa
RT	SSUT 1	Blanquecino/amarillento, redondeado. No mucosa 1-1,55	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	Sí
RT	SSUT 2	Blanquecino/amarillento, redondeado. No mucosa 1-1,56	<i>Bradyrhizobium canariense</i> (redundante SSUT1)	No
RT	SSUT 3	Blanquecino/amarillento, redondeado. No mucosa 1-1,57	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	No
RT	SSUT 31	Blanco lechoso, muy mucosa.	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	No
RT	SSUT 4	Blanco lechosos. Muy mucosa, Irregular- redondeada. 0,5-1mm	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	No
RT	SSUT 5	Blanco lechosos. Muy mucosa, Irregular- redondeada. 0,5-1mm	N/A	No
RT	SSUT 6	Blanca, lechosa, perla y mucosa. 5mm	<i>Agrobacterium rhizogenes / tumefaciens</i>	Sí
RT	SSUT 7	Blanco lechosos. Muy mucosa, Irregular- redondeada. 0,5-1mm	N/A	No
RT	SSUT 8	Blanquecino, poco mucosa, redondeado. =1mm	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	No
RT	SSUT 32	Blanquecino/amarillento, redondeado. No mucosa 1-1,57	<i>Nocardioides alpinus</i>	No
RT	SSUT 33	Salmón, no mucosa, colonias puntiformes.	N/A	No
RT	SSUT 34	Mucosa, blanquecina, redondeada-irregular	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	No
RT	SSUT 9	Blanco lechosos. Muy mucosa, Irregular- redondeada. 0,5-1mm	N/A	Sí
RT	SSUT 10	Amarillo blanquecino con reflejos azulados a la luz. Redondeado =1mm	<i>Mesorhizobium sp.</i> (<96%)	No
RT	SSUT 11	Blanquecino, perla, un poco mucosa. Redondeado-alargado. 2mm	N/A	No
RT	SSUT 12	Blanco, mucosa transparente "sucio" (parecido a 21). Colonias redondas. 6mm/5mm/5mm	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	No
RT	SSUT 13	Blanco lechosos. Muy mucosa, Irregular- redondeada. 0,5-1mm	<i>Bradyrhizobium canariense</i> (redundante SSUT14)	No
RT	SSUT 14	Blanco lechosos. Muy mucosa, Irregular- redondeada. 0,5-1mm	<i>Bradyrhizobium canariense</i> (<93%)	No
RT	SSUT 15	Blanco lechosos. Muy mucosa, Irregular- redondeada. 0,5-1mm	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	No
RT	SSUT 35	Mucosa, blanquecina, redondeada-irregular	<i>Bradyrhizobium canariense</i> (redundante SSUT36)	No
RT	SSUT 36	Mucosa, blanquecina, redondeada-irregular	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	No
RT	SSUT 37	Mucosa, blanquecina, redondeada-irregular	<i>Bradyrhizobium canariense</i> (redundante SSUT36)	No
LT	SSUT 16	Amarillo transparente. Poco mucosa, perla redondeada, con reflejo multicolor a la luz. 1-1,5mm	<i>Bosea sp.</i>	No
LT	SSUT 17	Amarillo lechoso. Irregular-redondo. Mucosa =5mm	<i>Bosea sp.</i>	No
LT	SSUT 18	Blanco lechosos. Muy mucosa, Irregular- redondeada. 0,5-1mm	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	No
LT+RT	SSUT 19	Blanquecino, puntiforme. Hay muy poco: no se pudo extraer: posible agarolítica.	N/A	No
LT+RT	SSUT 20	Blanco/amarillento. Redondeado-alargado >1mm	N/A	No
LT+RT	SSUT 21	Blanca, mucosa pero menos que SSUT 6. Colonias redondas/irregulares. Moco más hialino. 4mm/ 3mm	<i>Agrobacterium rhizogenes / tumefaciens</i>	Sí
LT+RT	SSUT 22	Transparente, reflejo azulado a la luz. Puntiforme, <0,5mm. Crecimiento muy lento.	<i>Bosea sp.</i>	No
LT+RT	SSUT 23	Rosa, no mucosa. Redondeada, puntiforme (<0,5mm). Reflejo multicolor a la luz.	N/A	No
LT+RT	SSUT 24	Amarillo transparente. Poco mucosa, perla redondeada. 1-1,5mm. Reflejo azulado a la luz.	<i>Bosea sp.</i>	No
LT+RT	SSUT 25	Blanca, mucosa pero moco relativamente opaco (blanco oscuro). Menos lechosa que 6 y 21. Colonias redondas: 4mm/4mm/3mm.	N/A	No
LT+RT	SSUT 26	Transparente, reflejo azulado a la luz. Puntiforme, <0,5mm.	N/A	No
LT+RT	SSUT 27	Blanco, mucosa transparente "sucio" (parecido a 21). Colonias redondas. 6mm/5mm/5mm	<i>Agrobacterium rhizogenes / tumefaciens</i>	Sí
LT+RT	SSUT 28	Amarillo oscuro/oro. No mucosa, colonias puntiformes (<1mm)	N/A	No
LT+RT	SSUT 29	Blanquecino, ligeramente mucosa: varias colonias unidas por un moco traslúcido "sucio". 1mm/1mm	<i>Neorhizobium galegae</i> (redundante SSUT30)	No
LT+RT	SSUT 30	Blanquecino, ligeramente mucosa: varias colonias unidas por un moco traslúcido "sucio". 1mm/1mm	<i>Neorhizobium galegae</i> (redundante SSUT30)	No
LT+RT	SSUT 38	Blanquecino/amarillento, redondeado. No mucosa 1-1,55	<i>Bosea sp.</i>	No
LT+RT	SSUT 39	Blanquecino/amarillento, redondeado. Más o menos mucosa. =2mm	<i>Bosea sp.</i>	No
LT+RT	SSUT 40	Mucosa, blanquecina, redondeada-irregular	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	No