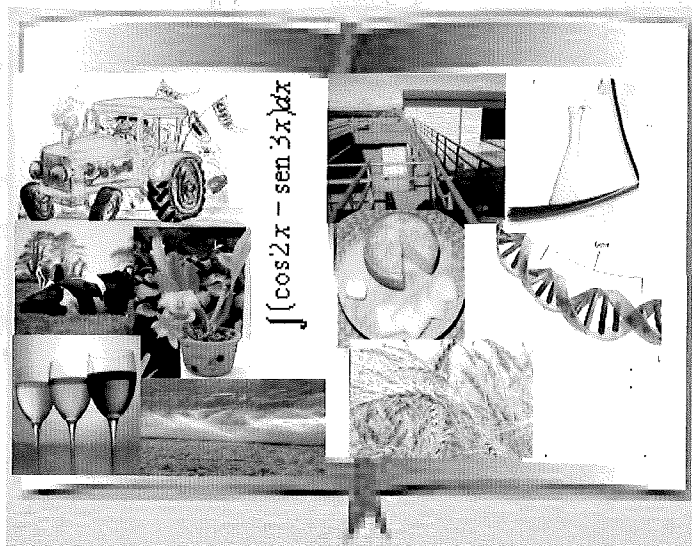


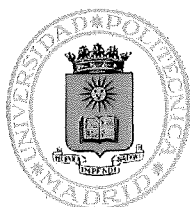
# V CONGRESO DE ESTUDIANTES UNIVERSITARIOS DE CIENCIA, TECNOLOGÍA E INGENIERÍA AGRONÓMICA

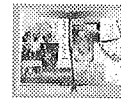


## Libro de Actas

Editado por P.G. Rebollar , A. Gili Pozo y M.A. Pérez-Cabal

8 y 9 de mayo de 2012  
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS  
Universidad Politécnica de Madrid





## ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE BACTERIAS ENDOSIMBIÓTICAS DE *GENISTA NUMIDICA*

Djenadi, Katia <sup>1</sup>; Duran, David <sup>2</sup>; Hadjira, Ahnia <sup>1</sup>

Tutores: Boulila, Farida <sup>1</sup>; Rey, Luis <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Biología, Universidad Mira Abderrahmane, Bejaia, 06000. Argelia.

<sup>2</sup>Departamento de Biotecnología, E.T.S. Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid, Ciudad Universitaria, s/n 28040 Madrid

Correo electrónico: djenadikatia@yahoo.fr; david.duran.wendt@alumnos.upm.es; djola.anna@hotmail.fr

### RESUMEN

Los rizobios son bacterias del suelo capaces de formar unas estructuras especializadas en raíces de leguminosas donde reducen dinitrógeno. Algunas de estas leguminosas, como *Genista numídica* Spach, juegan un importante papel ecológico y económico por la fertilización y la remediación de suelos áridos, lo que ha impulsado el estudio y la caracterización de los rizobios específicos.

En la presente investigación se analizan 53 cepas de rizobios aisladas de nódulos de raíces de *G. numídica* de la costa de Argelia. La diversidad genética de los aislados se llevó a cabo mediante la secuenciación del gen 16S rRNA y del espacio intergénico (ITS), región situada entre los genes 16S y 23S rRNA.

Los endosimbiontes de *G. numídica* muestran una gran diversidad filogenética. Las secuencias de los aislados mostraron proximidad a  $\alpha$ -proteobacterias (*Bradyrhizobium* sp, *Sphingobium* sp) y  $\gamma$ -proteobacterias.

**Palabras clave:** *Genista numídica*, diversidad filogenética, *Bradyrhizobium*

### INTRODUCCION

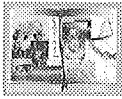
La tierra como ecosistema global depende en buena medida de actividades metabólicas de bacterias del suelo. Uno de esos procesos es la fijación biológica de nitrógeno producida principalmente por bacterias de vida libre o simbiontes asociados con leguminosas (rizobios), capaces de reducir el dinitrógeno a amonio que puede ser posteriormente asimilado por las plantas.

Los rizobios promueven la formación de estructuras en las raíces de las leguminosas denominadas nódulos que colonizan intracelularmente. Los rizobios descritos en estos momentos se distribuyen principalmente en 4 ramas de las  $\alpha$ -proteobacterias: *Rhizobium*–*Sinorhizobium*–*Mesorhizobium*–*Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, y *Methylobacterium*. También se han descrito rizobios pertenecientes al grupo de las  $\beta$ -proteobacterias (Moulin et al., 2004).

El género *Genista* incluye 90 especies de leguminosas arbustivas bien representadas en el área mediterránea, sin embargo sólo se han estudiado los endosimbiontes de algunas de ellas. Los correspondientes a *Genista tinctoria* L, *Genista monspessulana* (L) L. A. Johnson y *Genista linifolia* L han sido clasificados como *Bradyrhizobium* de crecimiento lento, mientras que las cepas aisladas de *Genista microcephala* Coss & Durieu que crece en una región árida de Túnez son rizobios de crecimiento rápido. *Genista saharae* Coss. & Reboud que también crece en Túnez forma nódulos con especies de los géneros *Ensifer* o *Rhizobium* (Mahdhi et al., 2007).

*Genista numídica*, crece en la costa argelina como arbusto silvestre y pertenece a la tribu *Genisteeae*. Hasta el momento no se han caracterizado bacterias capaces de nodular esta planta.

En este trabajo se presenta el análisis filogenético de bacterias aisladas de nódulos de *G. numídica* en base al gen 16S rRNA y al espacio intergénico (ITS) entre 16S y 23S rRNA. Las plantas proceden de la costa argelina.



## MATERIALES Y METODOS

### **Aislamiento y caracterización de endosimbiontes de *G. numidica***

La recolección de los nódulos se realizó en parcelas de 100 m<sup>2</sup> con predominio de *G. numidica*, 15 cm por debajo de la parte aérea de la planta. Los nódulos se desinfectaron superficialmente con alcohol y tras aplastarse en condiciones asépticas su contenido se extendió sobre placas de agar extracto de levadura manitol (YMA) como se describió en (Mahdhi et al., 2007). Tras 10 días de incubación a 28°C, se purificaron varias veces en YMA y se inocularon sobre semillas de *G. numidica* para confirmar su capacidad de nodular según el protocolo de Boulila et al., 2009.

De los aislados de los nódulos se examinó el color, morfología, presencia de mucosidad, tiempo de generación y tinción Gram. Para obtener el tiempo de generación se tomaron medidas de densidad óptica durante 24 horas cada 2 en medio YM a 28°C.

### **Amplificación de ADN**

El ADN se extrajo de cultivos de 5 días crecidos en medio YM (manitol extracto de levadura) usando el método de SDS-NaOH. El ADN purificado (1µl, 5–10 ng ADN) fue utilizado para amplificaciones mediante PCR. Las reacciones de PCR se realizaron según Sanchez-Cañizares et al., 2011 para la amplificación del gen 16S rRNA y para la región ITS según Laguerre et al., 1996.

### **Análisis de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos**

Los cromatogramas de las secuencias se analizaron con el programa Chromas 1.50. Los árboles filogenéticos con secuencias de referencia se llevaron a cabo mediante el análisis de remuestreo (bootstrapping) y el programa MEGA.5.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

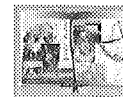
*G. numidica* es un arbusto silvestre, ampliamente distribuido en la costa argelina, crece en suelos arenosos a pH 6,8-7,2 con bajos niveles de carbono, nitrógeno y caliza.

Los nódulos recolectados en este trabajo mostraron una gran diversidad. Presentaron formas tanto determinadas como indeterminadas. Se obtuvieron más de 200 aislados de los cuales 53 confirmaron su capacidad de renodular su planta hospedadora, los nódulos fueron rojos sugiriendo una efectiva capacidad para fijar nitrógeno.

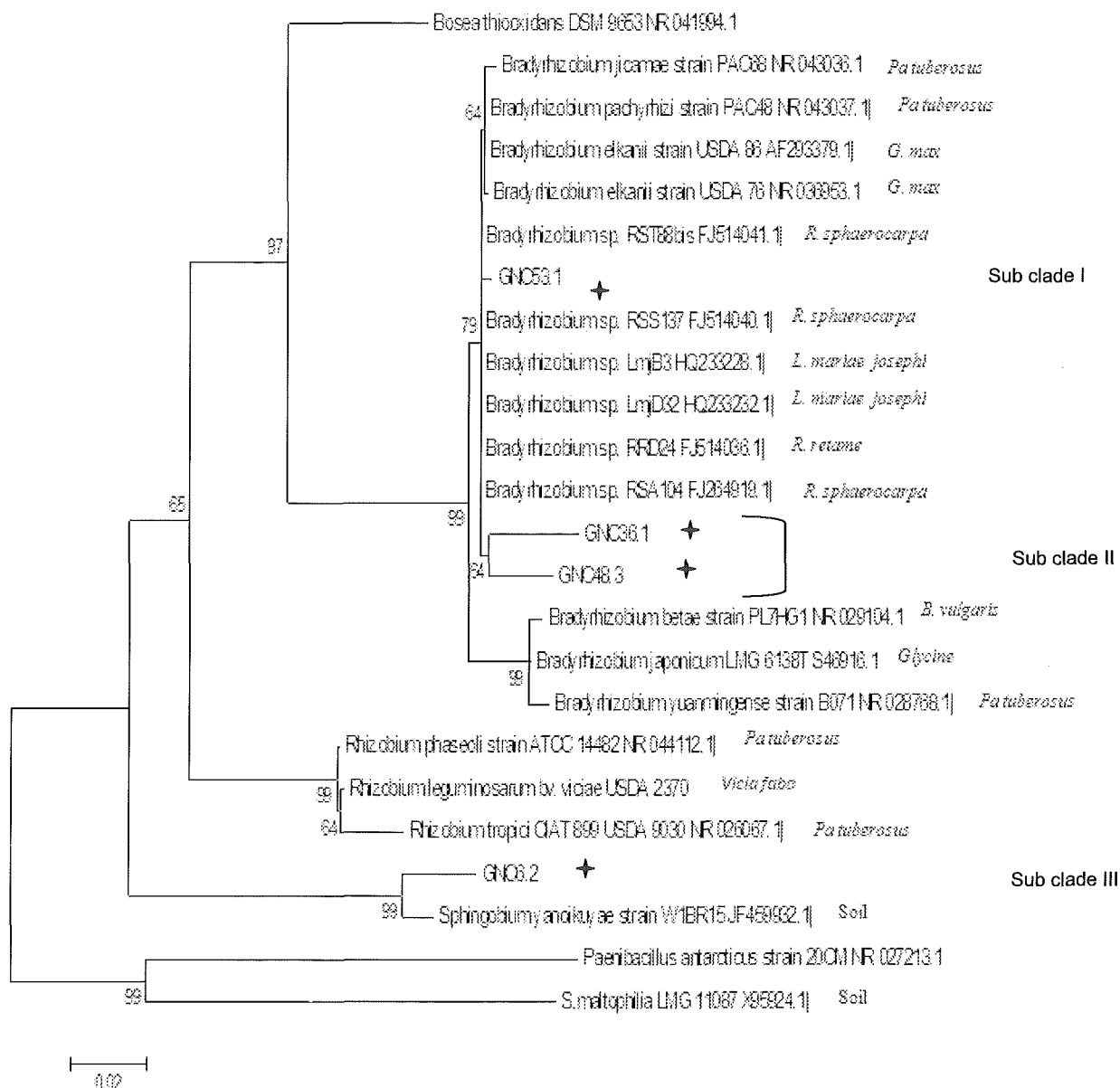
Las características fenotípicas de los aislados fueron diversas y se ha iniciado la caracterización de las cepas con crecimiento lento, es decir, aquellas que requirieron 5-6 días para generar colonias de 1 mm en placas de YMA. Dichas colonias fueron circulares, opacas y blancas. Cuando se observaron al microscopio se mostraron móviles y generalmente con gránulos de β-polihidroxibutirato con forma bacilar. Presentaron una tinción Gram negativa. El tiempo de generación fue de 4 horas, el intervalo de temperaturas a las que crecen fue de 26° a 37°C con un valor óptimo de 28°C. Todos los aislados fueron capaces de crecer a pH 6-8 en YM. Estas cepas soportan concentraciones de 100 y 200 mM NaCl.

La taxonomía de bacterias endosimbióticas de leguminosas se apoya en la comparación de las secuencias del gen 16S rRNA (Rivas et al., 2009). Sin embargo, a nivel de género, la información que se obtiene de estas secuencias es limitado debido al alto grado de conservación. La comparación de las secuencias entre los genes 16S y 23S RNA (ITS) se ha revelado muy útil ya que presenta una considerable variación incluso entre cepas relacionadas (Willems et al, 2003) y por tanto se está utilizando en la caracterización de bacterias endosimbióticas de leguminosas.

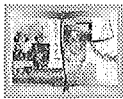
El análisis en este trabajo con las secuencias 16S rRNA ha permitido identificar los aislados de crecimiento lento de *G. numidica* como miembros de los géneros *Bradyrhizobium* y *Shingobium* (Ver figura 1) .



**Figura 1. Árbol filogenético basado en el alineamiento de 900 pb del gen 16SrRNA. Las cepas de *Genista numidica* se designan † GN . Se presentan los valores de “bootstrap” > 60% y 1000 réplicas. La escala muestra el número de sustituciones por sitio.**



Las cepas dentro del género *Bradyrhizobium* pertenecen a dos subgrupos, el primero incluye la cepa GNC53.1 que se agrupa con aislados descritos de *Retama sp* (RRD24, RSS137, RSA104, RST88bis) de Argelia (Boullila et al., 2009) y de *Lupinus mariae-josephae* (LmjD32, LmjB3) (Sanchez-Cañizares et al., 2011) de España. El otro incluye las cepas GNC36.1 and GNC48.3 y su separación está soportada por valores de bootstrap  $\geq 90\%$ . Estos resultados muestran una proximidad entre los aislados de varios miembros de tribu de leguminosas *Genisteeae*, *Retama* y *Lupinus* y están muy alejados de cepas de crecimiento rápido aisladas de especies de *Genista* que crecen en Túnez (Mahdi et al., 2007). La cepa GNC6.2, pertenece a un tercer subgrupo y mostró un alto grado de conservación respecto a especies de *Sphingobium* una  $\alpha$ -proteobacteria no



descrita como endosimbionte. GNC6.2 podría haber recibido los genes simbióticos por transferencia horizontal.

Por otra parte los datos obtenidos de las secuencias ITS son consistentes con los presentados en la Figura 1.

### CONCLUSIONES

Los aislados de *Genista numidica* argelinos mostraron una gran diversidad tanto fenotípica como genómica.

El análisis de las secuencias de los genes 16S rRNA mostró que los aislados de crecimiento lento pertenecen a los géneros *Bradyrhizobium* y *Sphingobium*. Los datos obtenidos con las secuencias intergénicas ITS son consistentes con los anteriores e indican gran diversidad entre estas cepas que podrá completarse con la comparación de otros genes básicos de estas bacterias.

### AGRADECIMIENTOS

A los profesores Abdelghani Boulila (Universidad Mira Abderrahmane de Bejaia) y Tomás Ruiz Argüeso (Universidad Politécnica de Madrid) por su consejo y sugerencias.

### BIBLIOGRAFÍA

- Boulila F., Depret G., Boulila A/G., Belhadi D., Benallaoua S and Laguerre G. 2009. Systematic and Applied Microbiology, 32:245–255.
- Laguerre G., Mavingui P., Allard M.R., Charnay M. P., Louvrier P., Mazurier S.I., Rigottier-Gois L and Amarger N. 1996.. Appl. Environ. Microbiol. 62:2029-2036.
- Mahdhi M., Nzoue A., Gueye F., Merabet C., de Lajudie P and Mars M. 2007. Letters in Applied Microbiology. 45: 604–609.
- Moulin L., Béna G., Boivin-Masson C., and Stepkowsky T. 2004. Mol Phylogenet Evol 30: 720–732.
- Rivas R., García-Fraile P and Velázquez E. 2009.. Microbiology Insights. 2:51–69.
- Sanchez- Cañizares C., Rey L., Durán D., Temprano F., Sánchez-Jiménez P., Navarro A., Polajnar M., Imperial J and Ruiz-Argüeso T.2011. Systematic and Applied Microbiology. 34: 207–215.
- Willems, A., Munive, A., de Lajudie, P. & Gillis, M. (2003).. Syst Appl Microbiol 26, 203–210.