

# Simbiosis bacteriana y conservación de flora amenazada: el caso de *Lupinus mariae-josephae*

*Lupinus mariae-josephae* H. Pascual es un altramuz endémico de un reducido número de sitios en la Comunidad Valenciana, donde coloniza sustratos de 'terra rossa' sobre afloramientos de lapiaz. Descrito en 2004 a partir de plantas cultivadas, no pudo localizarse en campo hasta 2006, y el hallazgo de sus poblaciones ha estado estrechamente ligado a topónimos relativos a su nombre popular, 'tramús' en valenciano (Navarro *et al.*, 2006; Fos *et al.*, 2006; Laguna *et al.*, 2006). Se ha demostrado la clara independencia genética, y en consecuencia el valor como 'buen taxon' de esta especie (Mahé *et al.*, 2010). Hasta ahora se han caracterizado y censado cinco poblaciones silvestres en diferentes localidades (Laguna *et al.*, 2009; Aguilera *et al.*, 2010), y en todas ellas se observan fuertes fluctuaciones interanuales de sus efectivos, a veces acompañadas de importantes diferencias de vigor de los ejemplares; tres de estas poblaciones están actualmente protegidas mediante sendas microrreservas de flora. Algunos de estos núcleos poblacionales se componen en años concretos de formas poco vigorosas, que a menudo sólo producen 1-2 frutos con 1-2 semillas; por el contrario, las formas más vigorosas pueden producir varias docenas de semillas. La emergencia de plántulas se produce con gran probabilidad tras años de progresiva escarificación de la cubierta de las semillas en el suelo, y probablemente se acelera por procesos de reducción de la cubierta vegetal como los incendios forestales. La germinación experimental *ex situ* sólo se consigue satisfactoriamente mediante el pretratamiento de escaldado de las semillas (Ferrer *et al.*, 2013).

Los intentos de cultivo de la especie en el Centro para la Investigación y Experimentación Forestal (CIEF) de la Generalitat Valenciana resultaron fallidos, rindiendo a lo sumo escasos ejemplares de la forma poco vigorosa. Estas experiencias coincidieron con el interés del equipo del Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas y del Departamento de Biotecnología de la ETSIA de la Universidad Politécnica de Madrid por caracterizar la relación simbiótica de esta especie de leguminosa con bacterias del suelo productoras de nódulos radiculares fijadores de nitrógeno ( $N_2$ ). Los trabajos en este sentido han revelado que existen bacterias endosimbióticas, identificadas como pertenecientes al género *Bradyrhizobium* por métodos genéticos y fenotípicos, en los suelos donde específicamente crecen plantas de las cinco rodales conocidos (Sánchez-Cañizares *et al.*, 2011; Durán *et al.*, 2013). Análisis filogenéticos y genómicos de las cepas de *Bradyrhizobium* aisladas han identificado nuevas entidades taxonómicas dentro de este género de rizobios. Entre las cepas aisladas representativas

de cada localidad se seleccionaron, en condiciones bacteriológicamente controladas en invernadero, las cepas simbióticamente más eficientes en fijación de  $N_2$  (resultados no publicados), y entre ellas se eligieron las cepas LmjC y LmjM3 por su mejor comportamiento en ensayos previos en laboratorio. En el marco de los contactos entre los equipos de técnicos e investigadores antes mencionados, se planteó la hipótesis de que la simbiosis bacteriana pudiera ser un factor limitante para la pervivencia de la especie de altramuz *Lupinus mariae-josephae* en ambientes naturales.

## Material y métodos

Tras diversos ensayos preliminares, en 2011 se planteó la siembra de *Lupinus mariae-josephae* en una zona de hábitat óptimo en las inmediaciones de la microrreserva de flora Loma de Coca (Real, Valencia), a unos 8 km de los núcleos poblacionales de esta especie en la Sierra del Besorí en Montserrat y Llombai. Se diseñaron tres tratamientos: plantas control sin inocular con bacterias seleccionadas, plantas inoculadas con la cepa LmjC y plantas inoculadas con la cepa LmjM3. Los cultivos bacterianos se obtuvieron en medio de caldo de levadura y manitol, y se inocularon en las semillas en base turba esterilizada y finamente molida a razón de 1 g de turba ( $5 \times 10^7$  ufc/g de turba/ 3 semillas); para el control se rodearon las semillas con la misma proporción de turba sin cultivo bacteriano.

Para el ensayo de campo se escogió una zona de 64 m<sup>2</sup>, dividida en tres secciones sucesivas para albergar cada uno de los tratamientos; la siembra se realizó a principios del otoño de 2011. Cada punto de siembra incluía una terna de semillas, a fin de favorecer un reforzamiento positivo de la inoculación, y tras observar que el patrón de plantas agregadas es frecuente de modo natural en las poblaciones próximas. Las cantidades totales sembradas en cada tratamiento fueron de 75 semillas del control, 90 con inóculo LmjM3 y 93 con inóculo LmjC. La falta de lluvias en la zona en el otoño de 2011 aconsejó el riego de la zona de siembra en el momento de la misma y en dos ocasiones más en las semanas siguientes.

La supervivencia se midió contando los individuos que habían llegado con éxito a la edad reproductora al final de la siguiente primavera. Para la estimación del éxito reproductivo, asociado al vigor de las plantas, se contó el número de semillas justo antes de la dispersión, observando el número de engrosamientos de las vainas.



Imagen de nódulo bacteriano sobre la raíz de *Lupinus mariae-josephae* (Foto: autores)



Siembras de altramuz para la experiencia realizada (Foto: autores)

## Resultados

Los resultados para la supervivencia y el número de plantas que alcanzan el estado reproductivo están sintetizados en la Tabla 1. Los valores de F obtenidos en el análisis simple de varianza fueron  $F=1,826$  ( $p=0,167$ ) para el número medio de plantas vivas por terna, y  $F=0,006$  ( $p=0,994$ ) para las que alcanzaban la edad reproductora. Al analizar los datos comparando los mismos valores por pares de tratamientos, tanto para el análisis de varianza como por el estadístico *t* de Student, los valores indican que no hay diferencias significativas en el efecto de las dos cepas bacterianas, pero sí entre cualquiera de ellas y el control (Tabla 2). En consecuencia las plantas inoculadas con cualquiera de ambas cepas alcanzan mayor grado de supervivencia y exhiben mayor número de plantas con éxito reproductivo.

Tratamiento	N° hoyos (ternas)	N° medio plantas vivas / hoyo	N° medio plantas reproductoras / hoyo
LmjC	31	1,742 ± 0,773 [58,07%]	1,613 ± 0,955 [53,76%]
LmjM3	30	1,800 ± 0,714 [60,00%]	1,633 ± 0,964 [54,43%]
Control	25	1,360 ± 0,569 [45,33%]	0,840 ± 0,943 [28,00%]

Tabla 1. Plantas vivas y de reproductoras obtenidas por terna de siembra. Entre corchetes se muestra el porcentaje sobre el total sembrado.

Supervivientes	F		t	
	LmjM3	Control	LmjM3	Control
LmjC	1,171, $p=0,672$	1,849, $p=0,126$	-0,058, $p=0,762$	0,382, $p=0,044$
LmjM3		$F=1,578$ , $p=0,257$		0,440, $p=0,016$
Reproductores	LmjM3	Control	LmjM3	Control
LmjC	0,981, $p=0,956$	1,025, $p=0,962$	-0,020, $p=0,934$	0,773, $p=0,004$
LmjM3		1,045, $p=0,921$		0,793, $p=0,003$

Tabla 2. Valores de los estadísticos F y *t*. Se utilizaron para la comparación del número medio de plantas por hoyo (terna) de siembra, tanto para la supervivencia total como para los pies que llegan a fructificar, comparando por pares los 3 tratamientos (control, e inoculación con cepas bacterianas LmjC y LmjM3)

El número medio de frutos y semillas obtenidos por planta se expresa en la Tabla 3. Los valores de F obtenidos fueron respectivamente 28,832 y 28,414, con  $p<0,0001$  en ambos casos. En la Tabla 4 se expresan los resultados de los tests estadísticos en la comparación de pares de tratamientos, cuyos resultados demuestran que la cepa LmjC da lugar a plantas con mayor número de frutos y semillas que las inoculadas con LmjM3, y éstas a su vez demuestran un comportamiento similar respecto del control.

Tratamiento	N° pies	N° medio frutos / planta	N° medio semillas / planta
LmjC	51	4,373 ± 3,124	12,725 ± 8,875
LmjM3	49	1,878 ± 0,696	4,653 ± 2,681
Control	22	1,273 ± 0,456	2,591 ± 1,182

Tabla 3. Valor medio de frutos a y semillas por planta.

N° frutos	F		t	
	LmjM3	Control	LmjM3	Control
LmjC	20,133, $p<0,0001$	46,962, $p<0,0001$	2,495, $p<0,0001$	3,100, $p<0,0001$
LmjM3		2,333, $p=0,037$		0,605, $p=0,0004$
N° semillas	LmjM3	Control	LmjM3	Control
LmjC	10,955, $p<0,0001$	56,416, $p<0,0001$	8,072, $p<0,0001$	10,135, $p<0,0001$
LmjM3		5,120, $p<0,0001$		2,062, $p=0,001$

Tabla 4. Valores de los estadísticos F y *t*. Se utilizaron para la comparación del número de frutos por planta y de semillas por planta en los ejemplares que llegaron a fructificar, comparando por pares los 3 tratamientos.

Para la experiencia desarrollada, el número total de semillas obtenidas por cada una de las plantadas, fue de 6,98 en el tratamiento LmjC, 2,53 con LmjM3 y 0,76 en el control. Ello implica que, de repetirse las condiciones del sitio y año de experiencia, la tasa de reposición obtenida sin tratamiento de inoculación bacteriana no permite asegurar la supervivencia de la población.

Aunque se está realizando una repetición de la misma experiencia en 2013, podemos adelantar que los resultados provisionales corroboran el comportamiento observado en 2012, lo que abre un importante horizonte en la conservación de la especie, cuyo éxito de instalación en futuras translocaciones de conservación podría mejorarse con la inoculación bacteriana, preferentemente con la cepa LmjC.

## ■ Bibliografía

- Aguilera, A., S. Fos, & E. Laguna, eds. (2010). *Catálogo Valenciano de Especies de Flora Amenazadas*. Generalitat Valenciana. Valencia.
- Durán, D., L. Rey, C. Sánchez-Cañizares, A. Navarro, J. Imperial & T. Ruiz-Argüeso (2013). Genetic diversity of indigenous rhizobial symbionts of the *Lupinus mariae-josephae* endemism from alkaline-limed soils within its area of distribution in Eastern Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 36: 128-136.
- Ferrer, P.P., I. Ferrando, C. Gago & E. Laguna, eds. (2012). *Manual para la conservación de germoplasma y el cultivo de la flora valenciana amenazada*. Generalitat Valenciana. Valencia.
- Fos, S., A. Navarro, I. Ferrando, S. Alba & E. Laguna (2006). Nuevas poblaciones del altramuz valenciano (*Lupinus mariae-josephi*). *Toll Negre*. 8, 21-26.
- Laguna, E., A. Navarro, S. Fos, I. Ferrando, J.M. Arregui & J. Juárez (2006). El altramuz valenciano: crónica de un redescubrimiento. *Quercus* 250: 24-27.
- Laguna, E., S. Fos & A. Navarro (2009). *Lupinus mariae-josephae* H. Pascual. In: Bañares, A. et al. (eds.): *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculosa Amenazada de España: Adenda 2008*: 52-53. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Madrid.
- Laguna, E., Fos, S. & Navarro, A. (2009). *Lupinus mariae-josephae* H. Pascual. In Bañares et al. (eds.): *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vasculosa Amenazada de España: Adenda 2008*: 52-53. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino. Madrid.
- Mahé, F. et al. (2010) New data and phylogenetic placement of the enigmatic Old World lupin: *Lupinus mariae-josephi* H. Pascual. *Genetic Resources and Crop Evolution* 58: 101-114.
- Navarro, A., S. Fos, I. Ferrando & E. Laguna (2006). Localización del endemismo aparentemente extinto *Lupinus mariae-josephi*. *Flora Montiberica* 33: 59-63.
- Sánchez-Cañizares, C. et al. (2011). Endosymbiotic bacteria nodulating a new endemic lupine *Lupinus mariae-josephi* from alkaline soils in Eastern Spain represent a new lineage within the *Bradyrhizobium* genus. *Systematic and Applied Microbiology* 34: 207-215.

# Descubierta una nueva población de *Vella pseudocytisus* subsp. *pau* en el valle del río Alfambra

Dentro de los trabajos del Plan de Recuperación del "crujiente", en el que se han implantado más de 80 parcelas en el Valle del río Alfambra próximo a la ciudad de Teruel, se encontró un ejemplar aislado de este arbusto y, buscando en zonas más elevadas próximas, se ha hallado una población de más de 5.000 ejemplares con una extensión de unas 11 ha.

A pesar de haber sido prospectada por numerosos botánicos, la zona no se detectó antes pues esta población ocupa litologías calizas en lo alto de los cerros y no prospera en suelos con abundancia de yesos que se extienden al pie de estos montículos. Comparte formaciones de matorral abierto con otros arbustos y matas como *Ononis tridentata*, *Ephedra nebrodensis*, *Phlomis lychnitis*, *Thymus vulgaris*, *Linum suffruticosum* y *Salvia lavandulifolia*, e incluso se ven en sus inmediaciones buenos ejemplares de sabina albar.

JOSÉ MANUEL GONZÁLEZ CANO ■

Técnico de Biodiversidad, Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente del Gobierno de Aragón, Teruel.



Aspecto de la recién descubierta población de crujiente (Foto: J.C. Moreno)