



## CARACTERIZACIÓN SIMBIÓTICA Y FILOGENÉTICA DE RIZOBIOS QUE NODULAN LA NUEVA ESPECIE *Lupinus mariae-josephi*

Sánchez, Paloma; Sánchez Carmen; Polajnar, Mira

Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Dpto. de Biotecnología. E.T.S.I. Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid.

Correo electrónico: paloma.sanchez.j@gmail.com; mcarmen\_s\_c@hotmail.com; mira.jagoba@gmail.com

### RESUMEN

Una nueva especie de altramuz, *Lupinus mariae-josephi*, ha sido identificado recientemente en Valencia (Pascual, H.). Esta especie, a diferencia de las descritas en la Península ibérica y en el viejo mundo, no crece en suelos ácidos sino en suelos alcalinos y con alto contenido en calcio.

El objetivo general de este proyecto es investigar si existen diferencias fenotípicas y genéticas entre los rizobios que nodulan *Lupinus mariae-josephi* y lupinos de suelos ácidos nativos de la Península Ibérica (*Lupinus angustifolius*, *L. luteus* y otras cuatro especies).

En este proyecto se han aislado bacterias (rizobios) de nódulos de *L. mariae-josephi* a partir de suelos básicos de Valencia (localidad de LLombai) y se está realizando su caracterización a nivel morfológico, nutricional, simbiótico y molecular.

A nivel molecular se han comparado los genes "housekeeping" 16S rRNA, *recA*, *atpD*, *gln2* y el simbiótico, *nodC* de diversas cepas que nodulan *L. mariae-josephi* y con cepas de otras especies de rizobios.

Por otra parte, también se está evaluando la capacidad de *L. mariae-josephi* de ser nodulada por diferentes rizobios bajo condiciones bacteriológicamente controladas.

**Palabras clave:** *Lupinus*, nodulación, rizobios

### INTRODUCCIÓN

El Género *Lupinus*, de nombre común altramuz, pertenece a la familia de las leguminosas; sus semillas, junto con las de la soja son una de las fuentes más ricas en proteína vegetal. Es un género de gran interés debido a su capacidad para fijar nitrógeno atmosférico, como otras leguminosas, gracias a la simbiosis con bacterias, globalmente conocidas como rizobios, mediante la formación de nódulos radiculares en los cuales se realiza dicha fijación. Su cultivo se ha realizado desde la antigüedad para la alimentación tanto humana como animal y para enterrado en verde con el fin de mejorar la fertilidad de los suelos. La mayoría de los lupinos son endémicos de América, pero algunos proceden del Viejo Mundo; en la Península Ibérica crecen ocho especies de este género siempre en suelos ácidos.

Una nueva especie de lupino, *Lupinus mariae-josephi*, ha sido recientemente descubierta en una región de Valencia con la especial característica de crecer en suelos alcalinos y con alto contenido en calcio. Las poblaciones de dicha especie se encuentran en peligro de extinción por lo que se han definido Microrreservas para su conservación.

En este proyecto se pretende la caracterización a nivel fisiológico, simbiótico y molecular de las cepas de rizobios que nodulan *L. mariae-josephi*, aisladas a partir de suelos de la Región Valenciana mencionada anteriormente mediante el uso de plantas trampa.

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### MATERIAL BIOLÓGICO BACTERIANO:

Las cepas utilizadas en este trabajo son las siguientes.

13 cepas aisladas en nuestro campo:

- *L. mariae-josephi*: A<sub>2</sub>, B<sub>1</sub>, B<sub>1b</sub>, B<sub>2b</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>4</sub>, B<sub>4a</sub>, B<sub>4b</sub>, C, D<sub>2b</sub>, D<sub>32</sub>, H<sub>2p</sub>, H<sub>2</sub>.

37 cepas, varias aisladas de otros lupinos en nuestro campo y otras cedidas por otro laboratorio:

- *L. luteus*: Islu 8, Islu 15, Islu 23, Islu 78.



- *L.cosentini* : Islu 12, Islu 9.
- *L.hispanicus* : Islu 40, Islu 19, Islu 21, Islu39, Islu41.
- *L.angustifolius*: Islu101, Islu 22, Islu 28, Islu 38, Islu 90, Islu 98.
- *L.micranthus* : Islu 122, Islu 13, Islu14.
- *L.albus* : Islu 203, Islu 27.
- *Ornithopus compressus* : Islu 16, Islu 33, Islu 127, Islu 154, Islu255, Islu 16/0/3, 861.
- *Glycine max*: Islu SJ92, Islu SJ93, Islu SJ94, Islu SJ98, Islu SJ99.
- *Vigna sp.* : 924.
- *Lotus corniculatus*: 835, TONO.

#### **MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO:**

Las cepas de rizobios utilizadas en este estudio se cultivaron a 28°C en los siguientes medios: YMB: extracto de levadura 0,4 g/l, manitol 1g/l, NaCl 0,1 g/l, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g/l, MgSO<sub>4</sub> para crecimiento general y conservación de las cepas. ELM: extracto de levadura 1g/l, manitol 10g/l, NaCl 0,1 g/l, , K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>0,3 g/l, Cl<sub>2</sub>Ca 0,05 g/l, Cl<sub>3</sub>Fe 0,01 g/l.

#### **EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL:**

El ADN total de las diferentes bacterias fue obtenido a partir de 2 ml de cultivo en fase exponencial en medio YMB según el método descrito por Corbin *et al.*(1982) y modificado por Leyva *et al.*(1987).

#### **AMPLIFICACIÓN DE ADN POR EL MÉTODO DE PCR:**

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados fueron obtenidos del estudio de varios artículos según el gen a amplificar. La técnica de PCR se adaptó para cada gen en cuanto a tiempo, temperatura de la fase de anillamiento y concentración de ADN empleado. Se han elegido los genes *16S rRNA*, *recA* (recombinasa A), *atpD* (ATP - asa), *glnII* (Glutamina sintetasa) como genes de funciones básicas (housekeeping). También se ha escogido *nodC* como gen simbiótico. Una vez obtenidos los productos de amplificación de la PCR se purificaron utilizando un Kit comercial "QIAquick PCR Purification Kit (250)" y fueron secuenciados por la empresa MACROGEN (Korea).

#### **ANÁLISIS FILOGENÉTICO:**

Las secuencias obtenidas para cada gen fueron sometidas a un alineamiento previo mediante el programa Sequencher con objeto de definir una región común. Los alineamientos de las secuencias fueron obtenidos usando el programa ClustalX siguiendo el análisis neighbor-joining de distancias según el número de cambios nucleotídicos en las secuencias . Con objeto de elaborar el árbol filogenético más probable se realizó un análisis tipo bootstrap. Los árboles filogenéticos obtenidos a partir de los alineamientos se visualizaron gracias al programa TreeView.

#### **CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS EN CONDICIONES BACTERIOLÓGICAMENTE CONTROLADAS:**

En los ensayos realizados para estudiar el comportamiento simbiótico de las cepas aisladas de *Lupinus mariae-josephi* se han utilizado semillas de las siguientes especies: *L.mariae-josephi*, *L. luteus*, *L. cosentini*, *L. angustifolius*, *L. albus*, *L. micranthus*, *L. gredensis*, *L. hispanicus*, *Ornithopus compressus*, *Glycine max.*, *Vigna sp.* y *Lotus corniculatus*. De estas semillas, *L.mariae-josephi*, *L. luteus*, *L. cosentini*, *L. angustifolius*, *L. micranthus* y *L. hispanicus* fueron escarificadas mecánicamente y esterilizadas sumergiéndolas un minuto en alcohol seguido de tres minutos en hipoclorito sódico al 20% y diez lavados en agua de medio minuto cada lavado. Las demás fueron esterilizadas siguiendo el mismo protocolo sin escarificación previa. Las semillas se mantuvieron a 28°C durante varios días para su germinación en agar-agua (1%). Las semillas de *Ornithopus compressus* se mantuvieron a 4°C (también en agar-agua (1%)) durante 48 horas antes de incubarlas a 28°C para su germinación. Una vez germinadas, las semillas se sembraron en unidades tipo Leonard con vermiculita como soporte inerte. Cada unidad se inoculó con 4 ml de cultivo de los correspondientes rizobios en YMB a 28°C durante un tiempo determinado dependiente de cada cepa oscilante entre 6 y 10



días. Por último, las plantas crecieron en cámara climática provista de iluminación (16h/día) y un ciclo de temperatura día/noche de 25°C / 18°C entre cuatro y cinco semanas.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### Análisis filogenético de las cepas aisladas de la nueva especie *L. mariae-josephi* :

- Mediante el análisis de las secuencias del gen **16SrRNA** , utilizado frecuentemente para clasificar microorganismos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Los genes *16SrRNA* más parecidos a los *16SrRNA* de los rizobios aislados de *L. mariae-josephi* correspondieron a genes de bacterias del género *Bradyrhizobium*. Dentro del genero *Bradyrhizobium*, la especie más próxima a los aislados de *L. mariae-josephi* correspondió a *B.elkani*. En una comparación filogenética del gen *16SrRNA* con genes de bacterias de la familia Rizhobiaceae, se observó que todos los genes de rizobios procedentes de *L. mariae-josephi* se agrupaban separados de los genes de bacterias que nodulan otros lupinos de la Península Ibérica. Se observó que en el análisis de este gen, las cepas de rizobis están alejadas de cepas del género *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* y *Rhizobium*.

- El análisis del gen **nodC**, implicado en la nodulación de leguminosas, mostró unas relaciones filogenéticas distintas a las encontradas con el gen *16SrRNA*.

En este análisis se observó que :

Los genes *nodC* de las bacterias aisladas de *L. mariae-josephi* volvieron a agrupar en conjunto y separados del grupo de las bacterias aisladas de lupinos de la Península Ibérica.

La proximidad de las cepas de *L. mariae-josephi* en este caso es mayor con las cepas aisladas de lupinos de la península que con las cepas de *B.elkani*, *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium*. Estas diferencias son debidas a la influencia de la planta (*Lupinus*) en la selección de los genes simbióticos que determinan la nodulación. El gen *nodC* codifica para la quitina sintetasa que fija la longitud de los factores de nodulación.

Figura1. Árbol filogenético 16SrRNA

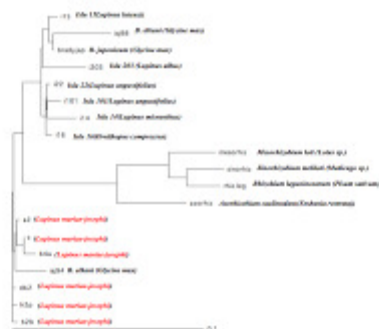
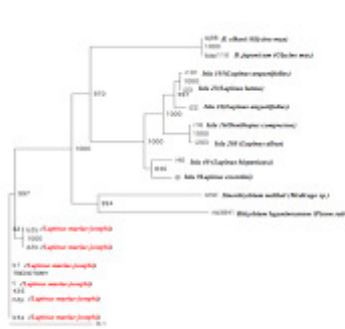


Figura2. Árbol filogenético nodC



#### Caracterización simbiótica de las cepas aisladas de *L. mariae-josephi*:

Los ensayos de nodulación cruzada fueron realizados en dos vertientes diferentes : por un lado se pretendió estudiar la capacidad simbiótica de las cepas aisladas en *L. mariae-josephi* para nodular especies de lupinos de la península y otras leguminosas cercanas; por otro lado, se analizó la especificidad simbiótica de *L. mariae-josephi* para ser nodulada por cepas aisladas de lupinos de suelos ácidos.

Estos ensayos han revelado que las cepas procedentes de *L. mariae-josephi* no nodulan *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. micranthus* y *L. gredensis* ni *L. hispanicus*. No obstante, dichas cepas sí nodulan y fijan nitrógeno aunque pobremente con *L.cosentini* y *L.albus*; la nodulación de *L. albus* por cepas de *L. mariae-josephi* no es muy significativa ya que esta especie es nodulada por una amplia gama de rizobios. Estas cepas, nodulan pobremente a *Vigna sp.*, pero sin fijar nitrógeno.



Se observó también que las cepas aisladas de *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. albus*, *L. cosentini*, *L. micranthus* y *Vigna sp.* nodulan escasamente a *L. mariae-josephi*, pero no fijan nitrógeno.

### CONCLUSIONES

Las cepas aisladas de la nueva especie *L. mariae-josephi*, pertenecen al género *Bradyrhizobium* en base al análisis del gen *16SrRNA*. Estos datos preliminares sugieren que los rizobios aislados de *L. mariae-josephi* están más próximos a *B.elkani* que a los rizobios aislados de lupinus de suelos ácidos nativos de la península. En base al análisis de *nodC* se pudo observar que las cepas procedentes de *L. mariae-josephi* se asemejan a las cepas procedentes de especies de lupinos de la península que a *B.elkani*, posiblemente por la importancia de la planta hospedadora en la relación de los genes simbióticos.

Se puede concluir de este trabajo que los rizobios que nodulan *L. mariae-josephi* en suelos alcalinos y calcáreos poseen características simbióticas y genéticas distintas de los rizobios de lupinos que crecen en suelos ácidos en la Península Ibérica. Entre estas características se han destacado la especificidad tanto en nodulación como en fijación de nitrógeno, de *L. mariae-josephi* con respecto a dichos lupinos con excepción de *L. cosentini* y *L.albus*.

Además, la caracterización fisiológica revela un mayor tiempo de generación para las cepas nodulantes de *L. mariae-josephi* que en el resto de las cepas de *Bradyrhizobium*.

### AGRADECIMIENTOS

Gracias a todo el equipo del laboratorio, Luís, Tomás, Pepe, Belén, Juan, Anabel, Carmen, Víctor, Rosabel, Javier... por ayudarme siempre que lo necesito cada día, uno tras otro; gracias por vuestra paciencia.

### BIBLIOGRAFÍA

- Corbin, D., Ditta, G., and Helinski, D.R. (1982) Clustering of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 149: 221-228.
- Harrison, C. J., Langdale, J.A. (2006) A step by step guide to phylogeny reconstruction. *The Plant Journal* 45: 561-572.
- Herrera-Cervera, J.A., Caballero-Mellado, J., Laguerre, G., Tichy, H-V., Requena, N., Amarger, N., Martínez-Romero, E., Olivares, J., Sanjuán, J., (1999) At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. *FEMS Microbiology Ecology* 30: 87-97.
- Gaunt, M.W., Turner, S.L., Rigottier-Gois, L., Lloyd-Macgilp, S.A., Young, J.P.W. (2001) Phylogenies of *atpD* and *recA* support the small subunit rRNA-based classification of rhizobia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 2037-2048.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuán, J., Drouin P., Amarger, N. (2001) Classification of rhizobia base don *nodC* and *nifH* gene análisis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147: 981-993.
- Leyva, A., Palacios, J.M., Mozo, T., and Ruiz-Argueso, T. (1987) Cloning and characterization of hydrogen uptake genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* 169: 4929-4934
- Pascual, H. (2004) *Lupinus mariae-josephi* (Fabaceae), nueva y sorprendente especie descubierta en España. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(1): 69-72.
- Stepkowsky, T., Hughes, C.E., Law, I.J., Markiewicz, L., Gurda, D., Chlebicka, A., Moulin, L.(2007) Diversification of Lupine *Bradyrhizobium* strains: evidence from nodulation gene trees. *Applied and Environmental Microbiology*, May2007, 3254-3264.
- Temprano Vera, F. (1990) Evaluación de la capacidad simbiótica de poblaciones nativas de *Bradyrhizobium sp. (Lupinus)* y de la necesidad de inoculación de altramuces (*Lupinus sp.*) en suelos españoles. Tesis Doctoral.
- Turner, S.L., Young, J.P.W. (2000) The glutamina synthetases of Rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol. Biol. Evol.* 17(2): 309-319.
- Vincent, J., M. (1970) A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwell Scientific Publications, Ltd.
- Vinuesa, P., Silva, C., Werner, D., Martínez-Romero, E. (2005) Population genetics and phylogenetic inference in bacterial systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 29-54.