



ANÁLISIS COMPARATIVO DE BRADYRHIZOBIA AISLADOS DE *Lupinus angustifolius* L. Y *Lupinus mariae-josephi*

López, Pablo; Durán, David R.

Tutores: Rey, Luis; Ruiz-Argüeso, Tomás

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

E-mail: pablo.layala@alumnos.upm.es

RESUMEN

Los altramuces (*Lupinus sp.*) son leguminosas con alto contenido proteico y alto valor en alimentación animal. Todas las especies de *Lupinus* que crecen en la Península Ibérica, incluida *L. angustifolius*, requieren suelos ácidos, excepto *L. mariae-josephi*, una especie recientemente descrita, que excepcionalmente crece en suelos alcalinos.

Se han analizado las relaciones filogenéticas entre bacterias endosimbióticas (rizobios) de *L. mariae-josephi* y de *L. angustifolius* y su posición evolutiva respecto a rizobios aislados de otras especies de *Lupinus* y de otras leguminosas. Con este fin se comparó la secuencia aminoacídica de proteínas esenciales ("housekeeping"), RecA, AtpD, GlnII, y de la proteína simbiótica NodC, así como también la secuencia nucleotídica intergénica 16S-23S (ITS).

La caracterización simbiótica de *L. angustifolius* y *L. mariae-josephi* implicó la realización de ensayos de inoculación cruzada, empleando plantas cuyos endosimbiontes están filogenéticamente próximos. Además, se estudió por microscopía de fluorescencia la distribución de bacteroides en los nódulos, utilizando rizobios que expresan GFP. Se espera identificar factores de la simbiosis con rizobios que capacitan a *L. mariae-josephi* para crecer en suelos básicos.

Palabras clave: *bradyrhizobia*, *Lupinus*, nodulación

INTRODUCCIÓN

El género *Lupinus* (altramuces) incluye un grupo diverso de leguminosas de gran importancia por su utilidad en alimentación humana o animal, ya que poseen unas de las semillas más ricas en proteínas, y por su interés ecológico, ya que pueden crecer en suelos áridos y pobres en nitrógeno. La mayoría de los altramuces son endémicos de América, pero algunos proceden del Viejo Mundo; en la Península Ibérica crecen siete especies de este género en suelos ácidos, cinco nativas *L. cosentinii*, *L. hispanicus*, *L. angustifolius*, *L. micranthus* y dos introducidas *L. albus* y *L. polyphillus* (Castroviejo & Pascual, 1999). La especie, *L. mariae-josephi*, recientemente descubierta en una región de Valencia (Pascual, 2004), resulta atractiva por ser la única especie descrita con capacidad de crecer en suelos alcalinos con alto contenido en calcio.

Los rizobios son bacterias capaces de fijar nitrógeno en unas estructuras especializadas llamadas nódulos de raíces de leguminosas entre las que se encuentran plantas de *Lupinus*. En nuestro grupo trabajamos con cepas de rizobios aisladas de nódulos de diferentes *Lupinus* y de otras leguminosas. Los datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que todos los rizobios aislados de especies de *Lupinus* pertenecen al grupo de *Bradyrhizobium*. En este trabajo nos vamos a centrar especialmente en la caracterización de dos cepas denominadas ISLU101 y LmjC aisladas de nódulos de *L. angustifolius* y de *L. mariae-josephi* respectivamente (Tabla 1). Aunque ambas cepas son capaces de nodular especies de *Lupinus*, LmjC es una cepa que crece extremadamente lenta y no presenta abundantes exopolisacáridos en placa a diferencia de ISLU101 que muestra una abundante mucosidad y crecimiento como otros Bradyrizobios ya descritos.



MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Material biológico

1.1 Bacterias y plásmidos: Tabla 1.

Tabla 1. Bacterias y plásmido empleado en este trabajo

Bacteria	Características relevantes	Fuente y/o referencia
ISLU101	Aislada de <i>Lupinus angustifolius</i>	Temprano, 1999
LmjC	Aislada de <i>L. mariae-josephi</i>	Este laboratorio
Plásmido		
pHC60	Contiene el gen <i>gfp</i> y Tc ^r	Cheng & Walter, 1998

1.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas de *Lupinus angustifolius* L., *Lupinus mariae-josephi* y *Retama sphaerocarpa* (L) Boiss.

2.- Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de rizobios utilizadas en este estudio se cultivaron a 28°C en medio Arabinosa-Gluconato (Sadovsky et al, 1987) tras comprobarse que en este medio era donde mejor crecía la cepa LmjC.

3.- Crecimiento de las plantas en condiciones bacteriológicamente controladas

Se utilizó la técnica descrita por Leyva et al, 1987 modificada. En función de la dureza de las semillas: no se escarificaron las de *L. angustifolius*, se escarificaron mecánicamente las de *L. mariae-josephi* y químicamente las de *Retama sphaerocarpa* (una hora en ácido sulfúrico concentrado). Posteriormente todas las semillas fueron desinfectadas sumergiéndolas un minuto en alcohol seguido de tres minutos en hipoclorito sódico al 2% y diez lavados en agua de medio minuto cada lavado. A continuación se depositaron en agar agua (1%) a Tª ambiente hasta su germinación. Las semillas de retama mejoraron su germinación con una incubación inicial de 48h a 4°C. Una vez germinadas, las semillas se sembraron en unidades tipo Leonard con vermiculita como soporte inerte, con dos plántulas por maceta. Cada unidad se inoculó con 4 ml de cultivo de los correspondientes rizobios y por último, las plantas crecieron en cámara climática provista de fotoperiodo (16h/día) y un ciclo de temperatura día/noche de 25°C / 18°C entre cuatro y cinco semanas.

4.- Obtención de la secuencia nucleotídica intergénica 16S-23S (ITS).

En primer lugar se obtuvo el ADN total de diferentes bacterias a partir de 2 ml de cultivo en fase exponencial en medio YMB a partir de columnas de purificación DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN Ltd.).

A continuación se amplificó por PCR la secuencia nucleotídica intergénica 16S-23S (ITS) utilizando los oligos FGP1490 y FGPL132 y en las condiciones descritas por Lei et al, 2008. Los productos de PCR se purificaron utilizando un Kit comercial "QIAquick PCR Purification Kit (250)" y fueron secuenciados por la empresa MACROGEN (Korea).

5.- Análisis filogenético:

Las secuencias de los genes *recA* (recombinasa A), *atpD* (ATPasa), *glnII* (Glutamina sintetasa II) como genes de funciones básicas (housekeeping) y la del gen *nodC* como gen simbiótico fueron obtenidas por P. Sánchez, 2009 y en este trabajo fueron traducidas usando "ExpASY Proteomics Tools", posteriormente se alinearon a través de "Basic Local Alignment Search Tool" junto con otras secuencias aminoacídicas presentes en el banco de datos de proteínas (NCBI). Un análisis similar se realizó con secuencias nucleotídicas intergénicas 16S-23S obtenidas como se indica en el apartado anterior. Posteriormente se elaboró el árbol filogenético de las diferentes secuencias con la herramienta "Robust Phylogenetic Analysis For The Non-Specialist" (Dereeper et al 2008)

6.- Observación de los nódulos por microscopia de fluorescencia

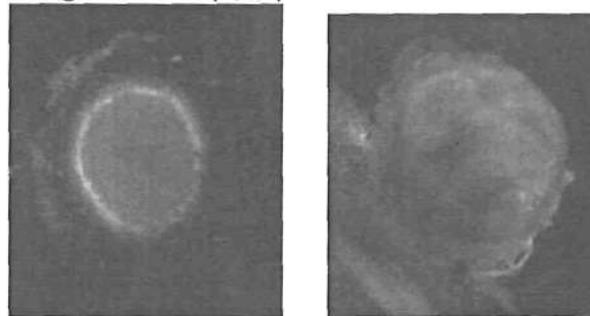
Con objeto de poder observar con detalle la distribución de bacterias en los nódulos de diferentes leguminosas se introdujo en las bacterias por conjugación el plásmido pHC60 portador del gen *gfp* bajo control de un promotor constitutivo (Chen & Walker, 1998).



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se observó que las cepas designadas LmjC e ISLU101 en ensayos de inoculación cruzada con las plantas de las que ha sido aisladas, *L. mariae-josephi* y *L. angustifolius* respectivamente, producen nódulos abundantes, rojos y capaces de fijar nitrógeno, sin embargo la cepa LmjC produce nódulos escasos, blancos e incapaces de fijar nitrógeno con *L. angustifolius*. La cepa ISLU101 produce nódulos abundantes, rojizos y poco eficientes con *L. mariae-josephi*. Con objeto de poder observar con detalle la distribución de bacterias en los nódulos de diferentes leguminosas se introdujo en las bacterias por conjugación el plásmido pHc60 portador del gen *gfp* bajo control de un promotor constitutivo (Chen & Walker, 1998). Los resultados obtenidos con la cepa ISLU101pHC60 mostraron en nódulos de *L. angustifolius* una distribución uniforme de bacterias con un anillo de mayor fluorescencia en la zona meristemática del nódulo (Imagen 1 Izquierda) sin embargo los nódulos de *L. mariae-josephi* presentaron menos bacterias y su distribución era irregular (Imagen 1 Derecha) consistentemente con la menor eficiencia en la fijación de nitrógeno observada respecto a nódulos de *L. mariae-josephi* inoculados con LmjC.

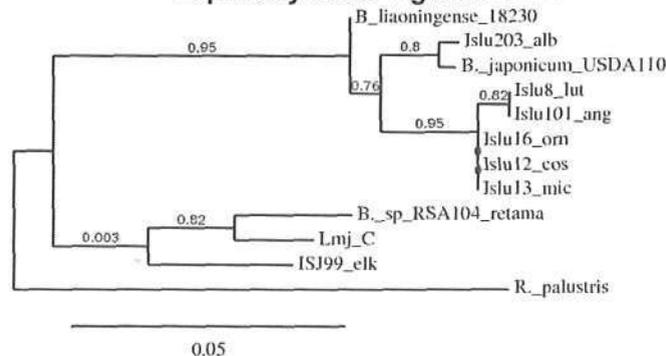
Imagen 1. Microscopía de fluorescencia de nódulos producidos por ISLU101pHC60. Izq: Nódulo de *L. angustifolius* (2,5X) Dcha: Nódulo de *L. mariae-josephi* (5x)



Por otra parte el análisis filogenético de las secuencias de proteína de RecA, GlnII, AtpD, NodC y el análisis de la región ITS de LmjC e ISLU101 mostró que todas las secuencias agrupan con bacterias de género *Bradyrhizobium*, sin embargo las secuencias de LmjC se agrupaba sólo con secuencias de otros aislados de *L. mariae josephi*, mientras que las secuencias de ISLU101 se agrupaban con las de aislados de diferentes *Lupinus* que crecen en suelos ácidos.

En el análisis filogenético con las secuencias de GlnII se ha encontrado que la secuencia de LmjC está muy próxima a la de una bacteria, RSA104, aislada de *Retama sphaerocarpa* (Boulila et al 2009). RSA 104 también ha sido descrita como una bacteria de crecimiento extremadamente lento y con poca mucosidad. Con esta información realizamos la inoculación de plántulas de *R. sphaerocarpa* con las cepas LmjC e ISLU101. En ambos casos se obtuvieron nódulos abundantes y rojizos.

Figura 1. Árbol filogenético de secuencias de proteína GlnII de rizobios aislados de *Lupinus* y otras leguminosas





CONCLUSIONES

Este estudio muestra que la cepa endosimbiótica LmjC, aislada de la única especie de *Lupinus* conocida que crece en suelos alcalinos, es una cepa diferente de todas las otras aisladas de *Lupinus sp* que crecen en suelos ácidos y entre los que se encuentra ISLU101. Además se ha demostrado una importante semejanza entre LmjC y RSA104 de *R. sphaerocarpa* tanto a nivel de secuencia como por la capacidad de LmjC de nodular *R. sphaerocarpa*.

Podemos concluir 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.

Los resultados de este trabajo pretenden contribuir a obtener inoculantes que faciliten una ampliación del área de distribución del género *Lupinus* en suelos alcalinos degradados y poco productivos.

AGRADECIMIENTOS

A todos aquellos cuyo conocimiento e investigación ha ayudado a llevar a cabo este trabajo. Muy especialmente a Ana Isabel Iglesias, Carmen Sánchez, Paloma Sánchez y Mira Polajnar y a los profesores Tomás Ruiz-Argüeso y Luis Rey Navarro

BIBLIOGRAFÍA

- Boulila F, Depret G, Boulila A, Belhadi D, Benallaoua S, Laguerre G. (2009) Retama species growing in different ecological-climatic areas of northeastern Algeria have a narrow range of rhizobia that form a novel phylogenetic clade within the Bradyrhizobium genus. *Syst Appl Microbiol.* Jul;32(4):245-55
- Castroviejo & Pascual (1999). *Flora Ibérica.* pp 251-260.
- Chen & Walter (1998) Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol.* 1998 Oct;180(19):5183-91.
- Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., Gascuel O. *Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist.* *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W465-9. Epub 2008 Apr 19.
- Laguerre, G., Nour, S. M., Macheret, V., Sanjuán, J., Drouin P., Amarger, N. (2001) Classification of rhizobia base on nodC and nifH gene análisis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* 147: 981-993.
- Lei X, Wang ET, Chen WF, Sui XH, Chen WX. (2008) Diverse bacteria isolated from root nodules of wild *Vicia* species grown in temperate region of China. *Arch Microbiol.* Dec;190(6):657-71
- Leyva A, Palacios JM, Mozo T, Ruiz-Argüeso T. (1987) Cloning and characterization of hydrogen uptake genes from *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol.* 1987 Nov;169(11):4929-34.
- Pascual, H. (2004) *Lupinus mariae-josephi* (Fabaceae), nueva y sorprendente especie descubierta en España. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61(1): 69-72.
- Sadowsky MJ, Tully RE, Cregan PB, Keyser HH. (1987) Genetic Diversity in *B. japonicum* Serogroup 123 and Its Relation to Genotype-Specific Nodulation of Soybean. *Appl Environ Microbiol.* 53(11):2624-2630.
- Sánchez, P (2009) Caracterización simbiótica y filogenética de rizobios que nodulan la nueva especie *Lupinus-mariae-josephi*. Trabajo fin de carrera ETSI Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid
- 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.